

**BRONZLAŖTIRICI OLARAK KULLANILAN
BAZI BİTKİSEL
UÇUCU YAĞLARIN SAĞLIKLI VE KANSERLİ
DERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE SİTOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŖTIRILMASI**

Handan EMİŖOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos-2013

**Bu tez alışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1005F115**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Handan EMİŞOĞLU' nun '*Bronzlaştırıcı Olarak Kullanılan Bazı Bitkisel Uçucu Yağların Sağlıklı ve Kansersiz Deri Hücreleri Üzerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması*' başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 02/ 08 / 2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı): Yard. Doç. Dr. Emel ERGENE		
Üye	: Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL	
Üye	: Doç. Dr. Asuman ZERGEROĞLU	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BRONZŞLAŞTIRICI OLARAK KULLANILAN BAZI BİTKİSEL UÇUCU YAĞLARIN SAĞLIKLI VE KANSERLİ DERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Handan EMİŞOĞLU

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE

2013, 125 sayfa

Bu çalışmada, kakao ve kayısı yağlarının malignant melanoma (Malme-3M) ve sağlıklı deri fibroblast (CRL-2120) hücreleri üzerine apoptotik ve sitotosik etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılığı üzerine etkiler WST-1, MTT ve NR alınımı yöntemleriyle, hücrelerin morfolojileri üzerindeki apoptotik etki AO-EB floresan boyamayla, p53 protein seviyesi ve yerleşimi immuno-işaretleme yöntemiyle floresan mikroskopta belirlenmiştir. Hücrelerin DNA içerik analizi ve hücre döngüsündeki gecikme oranlarıyla kaspaz-2 enzim aktivasyon seviyesi akım sitometride ölçülmüştür. CRL-2120 hücrelerinin UV-B ışınlarına karşı hassasiyeti tripan mavisi boyamayla belirlenirken, uçucu yağların seçilen UV-B dozları ile kombine etkisi WST-1 yöntemiyle araştırılmıştır. Uçucu yağlar ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde karakteristik apoptotik morfoloji gözlenirken, her iki yağın da hücre döngüsünün G₁ ve S evrelerinde tutuklanmaya sebep olduğu, kakao yağında; çekirdekte ve kayısı yağında ise; sitoplazma ve çekirdekteki p53 seviyesinin artış gösterdiği gözlenmiştir. Diğer yandan, kaspaz-2 enzim seviyelerinin, inkübasyon süresine bağlı olarak, zayıf bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, uçucu yağların UV-B ışınlarına karşı koruyucu bir etkisinin olmadığı da bu çalışmayla ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Malme-3M, CRL-2120, apoptoz, p53, UV-B, kaspaz-2

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF SOME HERBAL ESSENTIAL OILS USED FOR TANNING, ON NORMAL AND CANCER SKIN CELLS

Handan EMİŞOĞLU

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Biology Program

Supervisor: Asist. Prof. Dr. EMEL ERGENE

2013, 125 Pages

In this study, the cytotoxic and apoptotic effects of cocoa and apricot oils were investigated on malignant melanoma (Malme-3M) and normal skin fibroblast (CRL-2120) cells. The cell viability was determined by WST-1, MTT and NR uptake methods, apoptotic effect on cell's morphology by AO/EB fluorescence staining, p53 protein level and localization by immune-fluorescein method with fluorescence microscope. DNA content analysis of the cells and cell cycle arrest rates, caspase-2 enzyme activation levels were measured by using flow cytometry. CRL-2120 cells' sensitivities against UV-B rays were determined by trypan blue staining and combine effect of essential oils with selected UV-B doses was investigated using of WST-1 method. Malme-3M cells that are treated by essential oils have characteristic apoptotic morphology, both of two oils induced G₁ and S phases of the cell cycle arrest. Increase of p53 levels were observed in nucleus of cocoa oil treated cells, in cytoplasm and nucleus of apricot oil treated cells. However, a weak increase of caspase-2 enzyme levels were determined depending on incubation times. In addition, with this investigation, essential oils haven't any protective effects against to UV-B rays were revealed.

Keywords: Malme-3M, CRL-2120, apoptosis, p53, UV-B, caspase-2

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresi boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, manevi desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Emel Ergene'ye teşekkür ederim.

Labaratuvar çalışmalarım esnasında bana destek olan değerli labaratuvar arkadaşlarım Tuğba TUNCAY, Selda ARIÇELİK, Reyhan VAROL, Yıldız BODURLAR, Özlem TOMSUK, Emine ERDAĞ ve Murat KAYA'ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana sevgi ve ilgi gösteren, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim çok değerli babam Mestan EMİŞOĞLU, canım annem Ayşe EMİŞOĞLU, değerli abim Hakan EMİŞOĞLU, eşi Sevilay EMİŞOĞLU'na ve biricik yeğenim Doruk EMİŞOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Akım sitometri çalışmalarında bana yardımcı olan sevgili Şennur Görgülü'ye teşekkür ederim.

Handan EMİŞOĞLU

Ağustos, 2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Uçucu Bitki Yağları	1
1.2. Kanser.....	3
1.2.1. Deri kanseri	5
1.2.2. Kansere neden olan etmenler.....	8
1.2.3. UV-B ve deri kanseri.....	9
1.2.4. Hücre döngüsü ve kanser.....	11
1.2.4.1. Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar	12
1.2.4.2. Hücre döngüsü kontrol noktaları	14
1.2.5. Onkogenler	16
1.2.6. Tümör baskılayıcı genler	17
1.2.6.1. p53 geni	19
1.2.6.2. p53 geni yapısı.....	20
1.2.6.3. p53 proteininin hücrel fonksiyonları	21
1.2.6.4. p53 kararlılığının düzenlenmesi	24
1.2.6.5. Hücrede p53 proteininin yerleşimi	25
1.3. Apoptoz	26
1.3.1. Kaspazlar	27
1.3.2. Apoptoz mekanizmaları.....	29
1.3.3. Apoptozda meydana gelen morfolojik değişiklikler	32
1.4. Kaspaz-2 Aracılı Apoptoz Mekanizması	34

2. MATERİYAL VE YÖNTEM	37
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
2.2. Test Maddelerinin Hazırlanması	37
2.2.1. Yağ dozlarının hazırlanması	37
2.3. YÖNTEM	38
2.3.1. Hücre kültürü	38
2.3.2. Sitotoksikite Deneyleri	39
2.3.2.1. MTT ve WST-1 reaktifleri ile mitokondriyal aktiviteye dayalı sitotoksik etki belirlenmesi	39
2.3.2.2. Nötral kırmızısı (NR) alım testi ile lizozomal aktivite belirlenmesi	40
2.3.3. Apoptotik etkinin belirlenmesi	41
2.3.3.1. Akridin oranj/Etidyum bromid (AO/EB) çift boyama	41
2.3.3.2. Hücre döngüsü analizi	42
2.3.3.3. p53 proteininin immüno Floresan boyama yöntemiyle tespiti	43
2.3.3.4. Kaspaz-2 aktivasyonunun belirlenmesi	44
2.3.4. Sağlıklı deri hücrelerinde (CRL-2120) UV-B'nin sitotoksik etkisinin belirlenmesi	44
2.3.4.1. UV-B ışığında IC50 değerinin belirlenmesi	44
2.3.4.2. Kayısı ve kakao yağlarının sağlıklı deri hücrelerinin UV-B hassasiyeti üzerine etkilerinin belirlenmesi	46
2.3.5. İstatistiksel analiz	47
3. BULGULAR	48
3.1. Kakao Yağının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	48
3.1.1. CRL-2120 hücreleri	48
3.1.2. Malme-3M hücreleri	50
3.2. Kayısı Yağının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	52

3.2.1. CRL-2120 hücreleri.....	52
3.2.2. Malme-3M hücreleri.....	54
3.3. Malme-3M Hücrelerinde Apoptotik Morfoloji	56
3.3.1. Kakao yağı.....	56
3.3.2. Kayısı yağı.....	59
3.4. Malme-3M Hücrelerinde Hücre Döngüsü Analizi.....	61
3.4.1. Kakao yağı.....	61
3.4.2. Kayısı yağı.....	65
3.5. Malme-3M Hücrelerinde Aktif Kaspaz-2 Enzim Seviyesinin Belirlenmesi	67
3.5.1. Kakao yağı.....	67
3.5.2. Kayısı yağı.....	70
3.6. Malme-3M Hücrelerinde p53 Proteininin Sentezi ve Lokalizasyonu	74
3.6.1. Kakao yağı.....	74
3.6.2. Kayısı yağı.....	78
3.7. UV-B ışınlarının CRL-2120 Hücreleri Üzerine Etkisi.....	82
3.7.1. UV-B ışınlarının CRL-2120 hücrelerinin canlılığına etkisi	82
3.7.2. Uçucu yağların CRL-2120 hücrelerinin UV-B duyarlılığı üzerine etkileri	83
3.7.2.1. Kakao yağı.....	83
3.7.2.2. Kayısı yağı.....	88
4. TARTIŞMA	91
4.1. Kakao Yağının Sitotoksik ve Apoptotik Etkisi	91
4.2. Kayısı Yağının Sitotoksik ve Apoptotik Etkisi	99
4.3. UV-B ışınlarının CRL-2120 hücrelerinde tek başına ve uçucu yağlar ile kombine sitotoksik etkisi	104
KAYNAKLAR	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Epidermisde şekillenen temel hücre tipleri	6
1.2. Farklı UV dalga boylarının deriye nüfuzu	10
1.3. UV kaynaklı temel DNA lezyonları.....	10
1.4. Hücre döngüsü evrelerinde Cdk/Siklin komplekslerinin aktivite bölgeleri ve hücre döngüsü kontrol noktaları	13
1.5. p53 proteininin moleküler yapısı	20
1.6. Kaspazların yapısı ve aktifleşme mekanizması	28
1.7. Dış ve iç apoptotik yollar.....	31
1.8. Apoptozda meydana gelen morfolojik değişiklikler	33
1.9. Kaspaz-2 aracılı ve kaspaz-2 bağımsız apoptotik yollar	35
3.1. Kakao yağının CRL-2120 hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 (A), MTT (B) ve NR alınımı (C) ile değerlendirilmesi	49
3.2. Kakao yağının Malme-3M hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 (A), MTT (B) ve NR alınımı (C) ile değerlendirilmesi	51
3.3. Kayısı yağının CRL-2120 hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 (A), MTT (B) ve NR alınımı (C) ile değerlendirilmesi	53
3.4. Kayısı yağının Malme-3M hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 (A), MTT (B) ve NR alınımı (C) ile değerlendirilmesi	55
3.5. Kakao yağı etkisiyle Malme-3M hücrelerinin morfolojilerinde gözlenen apoptotik değişimler	57
3.6. Malme-3M hücrelerinde kakao yağı etkisiyle gözlenen apoptotik indeks.....	58
3.7. Kayısı yağı etkisiyle Malme-3M hücrelerinin morfolojilerinde gözlenen apoptotik değişimler	60
3.8. Malme-3M hücrelerinde kayısı yağı etkisiyle gözlenen apoptotik indeks.....	61
3.9. 1 µl/ml DMSO ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı	62
3.10. 18 µl/ml kakao yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı.....	63

3.11. 20 µl/ml kakao yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı	64
3.12. 24.5 µl/ml kayısı yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı	65
3.13. 26 µl/ml kayısı yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı	66
3.14. 1 µl/ml DMSO uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim	68
3.15. 20 ve 21.5 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim	69
3.16. 1 µl/ml DMSO uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim	71
3.17. 23 ve 24.5 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim	72
3.18. 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim	73
3.19. 1 µl/ml DMSO uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi	74
3.20. 18 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi	75
3.21. 20 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi	75
3.22. 21.5 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi	76
3.23. 12 ve 24 saat 1 µl/ml DMSO; 18, 20 ve 21.5 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 protein miktarı	77
3.24. 23 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi	79

3.25. 24.5 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M p53 proteinin hücre içi yerleşimi	79
3.26. 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi.....	80
3.27. 12 ve 24 saat 1 µl/ml DMSO; 23, 24.5 ve 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 protein miktarı	81
3.28. UV-B'nin CRL-2120 canlılığı üzerine etkisi	83
3.29. UV-B ^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mj/cm ² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 kontrol hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri	84
3.30. DMSO + UV-B ^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mj/cm ² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri	84
3.31. 34 µl/ml kakao yağı + UV-B ^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mj/cm ² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri.....	85
3.32. 35.5 µl/ml kakao yağı + UV-B ^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mj/cm ² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri.....	85
3.33. 37 µl/ml kakao yağı + UV-B ^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mj/cm ² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri.....	86
3.34. UV-B ve kakao yağı dilüsyonlarının CRL-2120 canlılığı üzerine kombine etkisinin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi.....	86
3.35. 35.5 µl/ml kayısı yağı + UV-B ^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mj/cm ² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri.....	88
3.36. 37 µl/ml kayısı yağı + UV-B ^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mj/cm ² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri.....	89
3.37. 38.5 µl/ml kayısı yağı + UV-B ^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mj/cm ² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri	89

3.38. UV-B ve kayısı yağı dilüsyonlarının CRL-2120 hücre canlılığı üzerine kombine etkisinin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi.	90
4.1. p53 proteininin transkripsiyonel aktivitesi.....	95
4.2. Kaspaz-2 aracılı ve kaspaz-2 bağımsız apoptotik yollar	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Malme-3M ve CRL-2120 hücrelerine maruz bırakılan kakao ve kayısı uçucu yağlarının uygulanan dilüsyonları	38
2.2. Kakao ve kayısı yağlarının UV-B hassasiyeti üzerine etkilerinin belirlenmesi için tasarlanan deney plakaları	46
3.1. Malme-3M hücrelerinde kakao yağının uyardığı apoptoz oranı ve yüzde dağılımı	58
3.2. Malme-3M hücrelerinde kayısı yağının uyardığı apoptoz oranı ve yüzde dağılımı	61
3.3. DMSO (1 µl/ml), 18 ve 20 µl/ml kakao yağı uygulanmış Malme-3M hücrelerinde 24 ve 48 saat sonundaki hücre döngüsü analizi	65
3.4. DMSO (1 µl/ml), 24.5 µl/ml ve 26 µl/ml kayısı yağı uygulanmış Malme-3M hücrelerinde 24 ve 48 saat sonundaki hücre döngüsü analizi.....	67
3.5. Malme-3M hücrelerinde 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde 1µl/ml DMSO; 20 ve 21.5 µl/ml kakao yağı ile muamele sonrasında kaspaz-2 enzim düzeyleri.....	70
3.6. Malme-3M hücrelerinde 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde 1µl/ml DMSO; 23, 24.5 ve 26 µl/ml kayısı yağı ile muamele sonrasında kaspaz-2 enzim düzeyleri.....	73
3.7. Malme-3M hücrelerinde kakao yağının p53 seviyesi üzerine etkisi.....	78
3.8. Malme-3M hücrelerinde kayısı yağının p53 seviyesi üzerine etkisi.....	80
4.1. Kakao yağının CRL-2120 ve Malme-3M hücrelerindeki IC50 değerleri	91
4.2. Kakao yağının insan deri kanserinde G ₁ /S ve G ₂ evrelerindeki tutuklanmaya etkisi	94
4.3. Kakao yağı uygulanmış deri kanseri hücrelerinde p53 seviyesi ve yerleşimi	94
4.4. Kakao yağı ile muamele edilen malme-3M hücrelerinde 48 saat inkübasyonda belirlenen canlı, apoptotik ve ölü hücre yüzdeleri	96
4.5. Kakao yağının Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzimi seviyesine etkisi	97
4.6. Kayısı yağının CRL-2120 ve Malme-3M hücrelerindeki IC50 değerleri.....	99
4.7. Kayısı yağının insan deri kanserinde G ₁ /S ve G ₂ evrelerindeki tutuklanmaya etkisi	101

4.8. Kayısı yağı uygulanmış deri kanseri hücrelerinde p53 seviyesi ve yerleşimi	102
4.9. Kayısı yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde 48 saat inkübasyonda belirlenen canlı, apoptotik ve ölü hücre yüzdeleri	102
4.10. Kayısı yağının Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzimi seviyesine etkisi.....	103
4.11. Kakao yağı dilüsyonları ve UV-B dozları kombinasyonunun CRL-2120 hücrelerinde canlılık üzerine etkisi	105
4.12. Kayısı yağı dilüsyonları ve UV-B dozları kombinasyonunun CRL-2120 hücrelerinde canlılık üzerine etkisi	106

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	: Apoptosis-inducing factor
AO	: Acridine Orange
CARD	: Caspase-recruitment domain
CDK	: Cyclin-dependent kinase
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DED	: Death effector domain
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EB	: Ethidium Bromide
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
FADD	: Fas-Associated protein with Death Domain
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
MDM2	: Murine Double Minute 2
MOMP	: Mitochondrial outer membrane permeabilization
PIDD	: P53-induced protein with a death domain
Rb	: Retinoblastoma
TNF	: Tumor necrosis factor
TNFR	: Tumor necrosis factor receptor
TRADD	: Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein
UV-B	: Ultra viyole B

1. GİRİŞ

1.1. Uçucu Bitki Yağları

Bitki uçucu yağları ve ekstraktları uzun yıllardır değişik amaçlara yönelik kullanılmaktadır (Hammer ve ark. 1999). Uçucu yağların tıbbi uygulamalarda kullanımı da uzun yıllara dayanmaktadır. Uçucu yağlar ve içerikleri hücre zarını geçebilen ve deri tarafından hızlı bir şekilde emilebilen lipofilik bileşenlerdir (Sœur ve ark. 2011).

Uçucu yağların antioksidan, antiseptik, aneljezik, antinflamatuar, antimutajenik, antimikrobiyal özelliklere sahip oldukları bilinmektedir ve birçok bitkiden hidro-distilasyon ya da buhar- distilasyonu gibi mekanik işlemler ile elde edilebilmektedir. Kolay elde edilebilir olmaları, tatlı aromaya ve düşük seviyede toksisiteye sahip olmaları birçok kronik hastalıkların uzun süreli tedavisinde kullanımını çekici kılmaktadır. Bu nedenle çeşitli uçucu yağ kaynaklı doğal ürünlerin taranması farklı kanserlerin tedavisinde umut vaat etmektedir (Sharma ve ark.2010; Sœur ve ark.2011).

Kakao yağı (*Theobroma cacao L.*); (kakao) tohumlarından elde edilen en yaygın üründür. Kakao tohumları, hindistan cevizi (% 64 yağ) dışında diğer önemli yağ tohumlarından daha fazla miktarda yağ oranı içermektedir (Pires ve ark. 1998). Kakao yağı özellikle güneş ve rüzgar yanıkları sonrasında derinin sakinleşmesi için kullanılır. Kakao yağı deriyi yumuşatıcı olarak ve birçok kozmetik karışımlarda yaygın kullanıma sahiptir (Aburjai ve Natsheh 2003). Kakao yağının yanıklarda yatıştırıcı, deri yaralarında temizleyici ve deri için nemlendirici krem olarak deri yüzeyine uygulanmasının birçok faydası olduğu bildirilmiştir (Davis ve Perez 2009).

Siyah ve yeşil çay, kırmızı şarap ve kakao tohumlarının antioksidan kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışmada kakaonun daha yüksek oranlarda toplam fenolik bileşen ve flavanoidler içeriğine ve antioksidan aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (Lee ve ark. 2003). Kakaoda bulunan flavanoller ve ilişkili oligomerleri aynı zamanda elma, badem, arpa, üzüm, çay, tarçın gibi çeşitli gıdalarda büyük oranda bulunan polifenollerdir. Kakaoda yüksek oranda bulunan

flavonoller epikateşin, kateşin ve bunların ilişkili prosiyanidin oligomerleridir (Carnésecchi ve ark. 2002).

Kakao ekstraktlarındaki polifenoller ile yapılan bir çalışmada bileşenlerin prostat kanser hücrelerinde çoğalmayı engelleyici etki gösterdiği sağlıklı prostat hücrelerinde ise etkili olmadığı belirtilmiştir (Jourdain ve ark. 2006). Ramljak ve arkadaşları, kakaodan türevlenen prosiyanidin bileşenlerinin insan akciğer ve meme kanser hücreleriyle sağlıklı insan epitelyal hücrelerini G₁ evresinde tutuklayarak hücre çoğalmasını engellediğini göstermişlerdir. Söz konusu etkinin akciğer kanseri hücrelerinde Cdc2 ve p53 gibi hücre döngüsü düzenleyicisi rolü olan bazı proteinlerin defosforilasyonu ve down regülasyonu ile gerçekleştiği de aynı çalışmada bildirilmiştir (Ramljak ve ark. 2005). Carne'secchi ve arkadaşları tarafından insan kolon kanseri hücreleri (Caco-2) ile yapılan bir çalışmada ise kakao tozu, prosiyanidin ve prosiyanidine zengin kakao ekstraktlarının antikanser ve apoptotik etkileri ortaya konulmuştur. Kakaonun prosiyanidin örneklerinin doza bağlı olarak hücre çoğalmasını inhibe edici etkisi gösterilmiş, hücre ölümünün apoptoz ile değil nekroz yoluyla gerçekleştiği, hücre çoğalmasını engelleyici etkinin hücre döngüsünün G₂/M evresinin durdurulması ile sağlandığı belirtilmiştir (Carnésecchi ve ark. 2002). Tan ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise kolon kanseri hücrelerinde, kateşin türevlerinin doza bağlı olarak hücre çoğalmasını engellediği, apoptozu uyardığı; bazılarının G₁ evresinde, bazılarının ise S evresinde tutuklanmaya neden olduğu bildirilmiştir (Tan ve ark. 2000).

Kayısı meyvesi, *Prunus armeniaca* Rosaceae familyası üyesidir. Vitamin ve mineraller bakımından zengin olduğu bilinen kayısı dünya çapında yaygın tüketilen meyvelerdendir (Yiğit ve ark.2009). Türkiye, dünyada büyük çoğunluğu Malatya olmak üzere en büyük kayısı üreticilerinden birisidir. Kayısı meyvesi; balgam söktürücü, tonik, antelmintik olarak kullanılmaktadır. Alternatif tıpta yüksek ateş, soğuk algınlığı, astım, bronşit, larenjit, kabızlık, kansızlık ve bazı tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Kaynatılmış kayısı kabuğunun tahriş olan deride yatıştırıcı etki gösterdiği bilinmektedir (Sehgal ve ark. 2010). Kayısı çekirdeği yağı masaj yağı olarak doğum sonrasında ve vücut ağrılarını azaltıcı amaçlı kullanılmaktadır (Sehgal ve ark. 2010).

Kayısı meyvesi; yağ, protein, lif, çözünebilir şeker, yağ asitleri; beta karoten, beta kriptoksantin, gama karoten ve likon gibi karotenoidler ve kateşin, epikateşin gibi fenolik bileşenler ve bazı mineraller açısından zengin bir kaynaktır (Erdoğan ve ark. 2011). Kayısı ve çekirdeği antioksidan özelliğe sahiptir (Yurt ve Çelik 2011). Kayısının bütanol ekstraktının bazı gram-pozitif ve negatif bakteriler üzerinde antibakteriyal aktivitesi araştırılmış, özellikle gram pozitif bakterilerde büyümeyi engelleyici etkisi ortaya konmuştur (Erdoğan ve ark. 2011). Bir başka çalışmada ise acı kayısının metanol ekstraktlarının gram negatif bakteri (*Escherichia coli*) üzerinde oldukça aktif olduğu gösterilmiştir (Yiğit ve ark. 2009). Sehgal ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada kayısı meyvesinin sulu ve ethanol ekstraktlarının anti-tüberküler etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur (Sehgal ve ark. 2010). Kayısı ekstraktının etken maddelerinden biri olan amigdalin ile kolon kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, amigdalinin hücre döngüsünde görev alan bazı genleri downregüle ettiği ve mRNA seviyelerinde azalışa neden olduğu belirlenmiştir (Park ve ark. 2005). Palozza ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada beta karotenin hücrelerde G₀/G₁ ve G₂/M evresinde tutuklanmaya neden olduğu gözlenmiştir. Beta karoten, bcl-2 protein miktarını azaltmış, p53 proteininden bağımsız olarak apoptozu uyardığı belirlenmiştir (Palozza ve ark. 2002). T lenfosit hücreleri ile yapılan bir çalışmada beta karoten, likopen, lutein, beta kriptoksantin apoptotik etkisi araştırılmış, beta karotenin apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Müller ve ark. 2002). Bir diğer çalışmada beta karotenin akciğer kanseri (MCF-7) hücresinde mitokondrial fonksiyon bozukluğu ve sitokrom c salınımı aracılığıyla hücreyi apoptoza götürdüğü belirlenmiştir (Chua ve ark. 2007).

1.2. Kanser

Kanser ve tedavisi gelişmiş ülkelerde en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Dünyada her yıl bir milyon kanser teşhisi konmaktadır (Ölgen ve ark. 2002). Son yıllarda yapılan istatistiklere göre kanser Amerika Birleşik Devlet'lerinde toplam ölüm oranlarının % 23'ünü oluşturmaktadır ve

kalp hastalıklarından sonra en yaygın ölüm nedeni olarak ikinci sırada gelmektedir (Anand ve ark. 2008).

Kanser genetik materyalin uzun bir zaman süreci içinde çeşitli mutasyonlarla hasara uğraması sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. Bu mutasyonlar, büyümeyi teşvik eden genlerin aktivasyonu, çoğalmayı baskılayan genlerin baskılanması, hücre ölümünün engellenmesi ve DNA onarım enzimlerinin baskılanması gibi hücresel mekanizmaları etkilemektedir. Genetik değişiklikler kanser hücresinin kontrol edilemez bir şekilde çoğalmasına, aşırı hücre birikimine ve sağlıklı dokulara yayılım gösteren malignant tümörlerin oluşumuna yol açmaktadır (Karp 2010; Yılmaz ve Altınok 2011; Demirelli 2003).

Tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere 2 tiptedir. Benign tümörler çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılım göstermezler. Canlı yaşamı için çok fazla tehlike oluşturmayan bu tümörler genellikle cerrahi operasyonla alınmaktadırlar. Buna karşılık malign tümörler hem çevredeki normal dokuya hem de besin ihtiyaçlarını gidermek için kan ve lenf yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılmaktadır (metastaz). Bu tümörlerin başka dokulara yayılıp onların fonksiyonlarını etkilemeleri hastalığın tedavi sürecini zorlaştırmaktadır (Cooper ve Hausman 2006; Dilsiz 2004; Yılmaz ve Altınok 2011).

Kanser, hücrenin davranışında önemli değişikliklere sebep olan kalıtsal ya da sonradan kazanılmış bir seri mutasyonlar sonucu gelişmektedir. Kanser hücresi, normal özelliklerini kaybederek hücrelerin morfolojisini, hücre yüzeyindeki proteinlerinin seviyesini, üremesini, yenilenmesini ve ölümünü etkileyecek anormal özellikler kazanır (Rieger, 2004). Temel olarak kanserin; kemik ve kas gibi mezenşimal dokulardan köken alan sarkomalar, epitelyal dokulardan köken alan karsinomlar ve kemik iliği, lösemi gibi hemapoetik ve lenfoid sistemlerden köken alanlar olmak üzere 3 tipi bulunmaktadır. Ancak kanser hücrelerinin farklı doku ya da kökene sahip olmalarına rağmen bazı ortak özellikleri bulunmaktadır (Karp 2010; Nussbaum ve ark. 2005).

Kanser hücreleri,

1. Kendi mitotik sinyallerini üretirler.
2. Eksojen büyüme engelleyici sinyallere direnç gösterirler.
3. Programlı hücre ölümünden (apoptoz) kaçınırlar.
4. Sınırsız replikasyon potansiyeline sahiptirler.
5. Damar oluşturabilirler (anjyogenez).
6. Doku invazyonu ve metastaz potansiyeline sahiptirler.

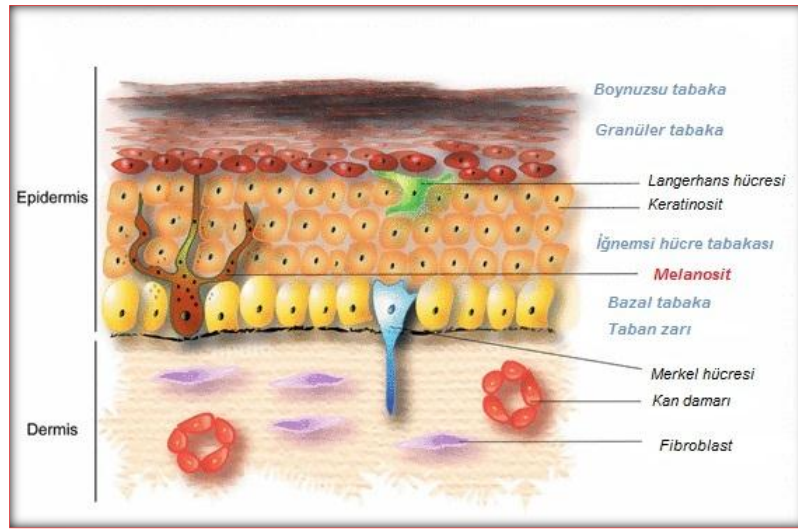
Kanser hücrelerinin kazanmış olduğu bu özellikler büyük oranda malignant davranışlardan sorumludurlar (Hanahan ve Weinberg 2000; Harrington 2011; Rieger 2004).

Normal bir hücrenin kanser hücreğine dönüşümü (karsinogenez) birkaç yıl ya da daha uzun yıllar sürebilmektedir. Karsinogenez başlangıç, gelişme ve ilerleme aşamalarından oluşan çok basamaklı bir süreçtir. Karsinogenesizin ilk basamağı, kanser oluşturan etmen yani karsinojen ile doku hücrelerinin DNA'sı arasında bir reaksiyon gerçekleşmesidir. Gelişme süreci öncü-tümör hücrelerinin birikiminin arttığı aşamadır. İlerleme, tümöre dönüşümün son aşamasıdır ve sağlıklı dokuları istila etme, diğer dokulara yayılma potansiyeline sahip tümörün büyümesini içermektedir (Kang ve ark. 2011; Reddy ve ark. 2003).

1.2.1. Deri kanseri

Deri kanseri Amerika Birleşik Devlet'lerinde görülen en yaygın kanser tipidir. Son yıllarda dünya genelinde çevredeki ve yaşam biçimlerindeki değişiklikler sebebiyle deri kanseri yayılışında önemli bir artış bulunmaktadır (Gaddameedhi ve ark. 2011). Deri kanseri, güneşte çok zaman harcayan açık tenli insanlarda daha yaygındır. Deri kanseri vücudun herhangi bir yerinde oluşabilir ancak düzenli olarak güneş ışığına maruz kalan yüz, kollar ve eller gibi yerlerde bulunma ihtimali daha yüksektir. Deri kanserinin en yaygın işareti büyüme gösteren ya da iyileşmeyen yaradır (Keeney ve ark. 2009). Deri kanserlerinin çok erken evrede görsel olarak farkedilebilir olması bir avantajdır. Bu durum, erken uygulanmaya başlanmasıyla tedavilerin daha başarılı olabileceği anlamına gelmektedir (de Gruijl ve ark. 2001).

Deri, embriyonik mezoderm ve ektodermden oluşan ve organizma ile çevre arasında bir bariyer oluşturan kompleks bir dokudur. Epidermis, çoğunlukla yetişkin yaşamı boyunca kök hücreler tarafından yenilenen keratinositlerden oluşan derinin en dış tabakasıdır. Epidermiste keratinositlerin yanında 3 hücre tipi daha bulunmaktadır. Melanin pigmenti üreten melanositler, lenf nodüllerinde antijen taşıyan hücreler olarak hareket eden langerhans hücreleri ve adapte edici mekanoreseptör olarak düşünülen merkel hücreleri bulunmaktadır (Şekil1.1.) (Pons ve Quintanilla 2006).



Şekil 1.1. Epidermiste şekillenen temel hücre tipleri (Pons ve Quintanilla 2006)

Dünya genelinde giderek yaygınlaşan bir hastalık olan melanoma öldürücü bir deri kanser formudur. Çeşitli epidermal hücrelerin transformasyonu farklı tiplerde deri kanserlerine neden olmaktadır (Scherer ve Kumar 2010). Üç temel deri kanseri tipi bulunmaktadır. En yaygın olanı bazal hücreli karsinomdur, skuamöz hücreli karsinom ve kutanöz malignant melenoma da diğerleridir (Gandini ve ark. 2009).

Deri tümörleri içerisinde en kötü huylusu olan malignant melanoma (MM) melanin üretebilen hücrelerin transformasyonu sonucu gelişmektedir (Özgenel ve ark. 2002). Melanomanın uyarıcı belirti ve işaretleri; bir bende meydana gelen büyüklük, renk ve şekil değişiklikleri, bir benden sızıntı ve kanama, kaşıntı, kabarıklık ya da şişkinlik hissi veren benlerdir (Keeney ve ark. 2009).

1970'lerden bu yana, melanoma insidansı her yıl % 3-7 oranında artarken ölüm oranı % 60 oranında artmaktadır. Melanoma, Amerika Birleşik Devlet'lerinde tüm deri kanserlerinin % 5'ini oluştururken deri kanseri ilişkili ölümlerin çoğundan sorumlu tutulmaktadır. Çünkü melanoma, ileriki evrelerde tespit edildiğinde büyük oranda ölümle sonuçlanmaktadır (Kanavy ve Gerstenblith 2011).

Cilt rengi ve hassasiyet oranı, coğrafik konum ve güneş maruziyeti gibi etyolojik faktörler melanomanın yanı sıra melanoma olmayan kanserlerle de ilgili risklerdir (Scherer ve Kumar 2010). Deri kanserine sebep olan en temel ajan güneş ışığının UV bileşenidir. Deri kanserine yakalanma oranı; Kafkaslarda % 20-30, Asyalılarda % 2-4, zenci ve Asyalı Hintlilerde % 1-2 olarak görülmektedir. 2006 yılında melanoma oranı ise zencilerde % 1-8, Asyalı Hintlilerde % 10-15 ve Japonlarda % 19 olarak belirtilmiştir (Narayanan ve ark. 2010). Coğrafik konum ve enlem ile melanom görülme oranı arasında ters bir ilişki mevcuttur. Ekvator bölgelerinde yüksek oranda melanoma görülmesinin başlıca sebebi güneş ışığına fazla maruziyettir. Bununla birlikte, Kuzey İskandinav ülkelerindeki yüksek melanoma oranı ile Güney Avrupa ülkelerindeki oran karşılaştırıldığında; yaş, cinsiyet, sosyo-ekonomik konum, iklim, güneş ışınlarına karşı hassasiyet, etnik farklılık ve deri pigmentasyonundaki farklılık gibi çeşitli faktörlerde etki etmektedir. Özellikle erken yaşlardan itibaren yoğun güneş ışınlarına maruziyetin melanoma etyolojisinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda, UV ışımasına maruz kalınan zaman ile melanoma riski arasında doğrusal bir ilişki olduğu bulunmaktadır. (Kanavy ve Gerstenblith 2011). Melanoma oranının düşük olduğu bir bölgeden ekvatora daha yakın bölgeye göç eden açık tenli insanlarla bu bölgede doğanlar karşılaştırıldığında melanoma oranının daha düşük olduğu görülmektedir (Geller ve Anans 2003). Örneğin yüksek UV ışımasının görüldüğü Avustralya'da doğan bir kişi 10 ya da üzeri yaşlarda Kuzey Avrupa'dan buraya göçmüş kişilere göre daha fazla melanoma riski taşımaktadır (Rigel 2010).

1.2.2. Kansere neden olan etmenler

Kanser gelişiminden sorumlu etmenler ekzojen ve endojen olmak üzere sınıflandırılabilir. Endojen faktörler; bazı hastalıkların sebep olduğu immün özellikler, kalıtsal mutasyonlar, hormonal denge bozuklukları, yaş gibi faktörleri içermektedir. Eksojen faktörleri ise beslenme alışkanlıkları, sosyoekonomik konumlar, yaşam tarzı, iyonize ve iyonize olmayan ışıma gibi fiziksel etmenlerle, doğal ya da sentetik kimyasal bileşikler ve virüsler gibi bazı biyolojik ajanlar oluşturmaktadır. Aşırı alkol tüketimi, tütün ve ilgili ürünlerini soluma, mikotoksinle kontamine bazı yiyeceklerin tüketimi gibi sağlıksız yaşam biçimi alışkanlıkları birçok popülasyonda bazı tümörlerin gelişiminden yüksek oranda sorumludur (Oliveira ve ark. 2007; Anand ve ark. 2008).

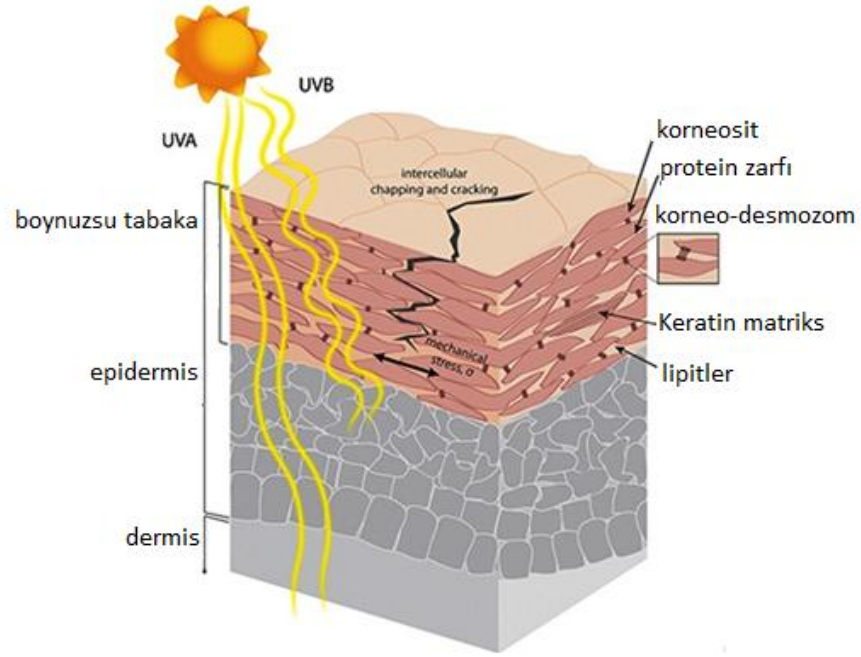
Fiziksel ve kimyasal ajanlar DNA hasarına neden olmaktadır. Kimyasal etkenler; DNA'da; baz değişikliği, yanlış baz eşleşmeleri, baz eksilme veya artışı, bazı bağların kopması gibi etkilere yol açarak mutasyonlara neden olabilmektedir. DNA bazına benzer yapıya sahip olan 5-bromouracil, 5-fluorouracil ve 2-aminopurine gibi bazı bileşikler (baz analogları), replikasyon sırasında pürin ve pirimidin bazlarının yerine geçerek DNA 'ya bağlanabilmekte ve yeni sentezlenen DNA'da yanlış baz çiftleri oluşumuna yol açmaktadırlar (Jun 2010; Yıldırım ve ark. 2007). Hardal gazı, nitrozoguanidin, metil metansülfonat, etil metansülfonat gibi kimyasal ajanlar bazlara metil ya da etil grupları ekleyerek bazların yıkılmasına ve DNA'da baz içermeyen bölge oluşumu ile hatalı eşleşmeler neden olmaktadır (Jun 2010; Debeleş-Bütünler ve Kantarci 2006). Akridin oranj, etidyum bromid ve proflavin gibi etkenler DNA bazlarının arasına girerek DNA'ya baz çifti eklenmesine ya da DNA'dan baz çifti çıkarılmasına yol açarak çerçeve kayması mutasyonlarına neden olmaktadır. Fiziksel Mutajenler; ultraviyole, Gama ve X-ışınları gibi etkenlerdir (Yıldırım ve ark. 2007). Gama ve X ışınları (iyonize radyasyon) çapraz bağ oluşumu, baz hasarı ve tek ya da çift zincir kırıkları gibi DNA hasarlarının oluşumuna neden olmaktadır (Hudson ve ark. 2011).

1.2.3. UV-B ve deri kanseri

Güneş kaynaklı Ultraviyole (UV) ışımalarının insan hayatında önemli rolü bulunmaktadır: vitamin D üretimi için temel oluşturan UV ışını aynı zamanda insanlarda çeşitli deri kanserlerinin oluşumuna sebep olan güçlü bir karsinojendir. (Biniek ve ark. 2012) İnsan derisi; gün içinde güneş, mesleki ışık kaynakları ve ışın tedavisi sistemleri gibi yollarla UV'ye maruz kalmaktadır. UV ışını; X ışınları, gamma ışınları gibi kısa dalga boylu ışınlarla mikrodalga ışınları gibi uzun dalga boylu ışınları kapsayan elektromanyetik ışın dizininin bir bölümüdür. UV ışığın fotonları ise oldukça enerjiktir ve biyolojik moleküllerde fotokimyasal reaksiyonları başlatabilmektedir (Hussein, 2005).

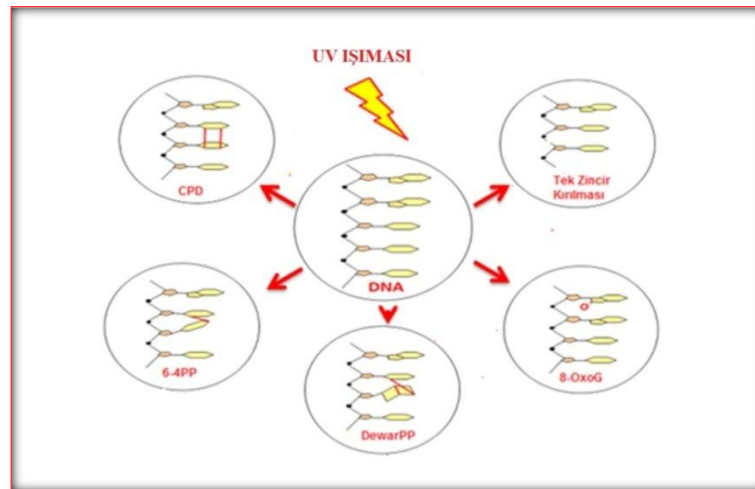
UV ışığı, dalga boylarına göre üç gruba ayrılmaktadır: UV-A, 315-380 nm; UV-B 280-315 nm ve UV-C 190-280 nm dalga boylu ışınlardır. Işımanın enerji içeriği ile dalga boyu arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. UV-C en kısa dalga boyuna sahip olmakla beraber en zararlı UV ışığıdır. Ancak ozon tabakası ~310 nm.den kısa dalga boylarını absorbladığı için UV-C ışınları yeryüzüne ulaşamamaktadır. İnsan derisine %90'dan fazla UVA ve % 10 kadar da UVB ışınları ulaşmaktadır. Bununla birlikte, stratosferik ozon miktarındaki azalış, güneşten salınan UV ışınlarına karşı stratosferin filtre görevini azaltmakta ve dünyaya ulaşabilen kısa dalga boylu ışınların oranı artmaktadır (Latonen ve Laiho 2005; Tekbaş ve ark. 2005; Kanavy ve Gerstenblith 2011).

UV ışığı, deride farklı tabakalar tarafından dalga boyuna bağlı olarak emilmektedir (Şekil 1.2). UVB ışınlarının neredeyse tamamı epidermis tarafından emilirken, enerjisinin sadece % 20'si epidermal bazal tabakaya (dermal stratum papillere) ulaşmaktadır. UVA dermis tabakasından daha derine doğru nüfuz edebilmekte ve enerjisinin % 30-50'sini epidermal bazal tabakaya ulaştırabilmektedir. Bu emilim özellikleri, UVB'nin deri kanser gelişimi gibi etkilerinin ağırlıklı olarak epidermis tabakasinda, UVA'nın sebep olduğu ise solar elastosisi, deri yaşlanması gibi durumların dermis tabakasinda oluşmasının sebepleri hakkında kısmen de olsa bir açıklık getirmektedir (Reichrath 2006).



Şekil.1.2. Farklı UV dalga boylarının deriye nüfuzu. UVB daha çok epidermise nüfuz etmektedir (Biniek ve ark.2012)

UV ışımaya karşı derinin yanıt oluşturabilmesi için, fotonların deri tabakaları yoluyla geçirilmesi, melanin, karoten, amino asitler ve DNA gibi biyomoleküller tarafından absorblanması ve biyolojik reaksiyonları başlatması gerekmektedir (Hussein, 2005). UV ışını; fotoyaşlanma ve deri kanserinde önemli rol oynayan DNA hasarı, gen mutasyonları, immün baskılanma, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtlara neden olmaktadır (Narayanan ve ark. 2010).



Şekil 1.3. UV kaynaklı temel DNA lezyonları (Yagura ve ark. 2011)

UV ışıması ile uyarılan önemli hücresel etkiler (hücre ölümü ve mutasyonların oluşumu) ilk olarak DNA lezyonlarının oluşumu ile başlayan olaylar zinciri ile ilişkilidir (Yagura ve ark. 2011). UV-B ışıması siklobüton pirimidin dimerleri, pirimidin 6-4 pirimidon fotoürünleri ve Dewar izomerleri gibi DNA lezyonlarının oluşumuna yol açmaktadır (Rastogi ve ark. 2010) (Şekil 1.3). DNA bazları UV-B'ye yakın dalga boyu oranlarındaki yüklü fotonları doğrudan absorblamaktadır (Ichihashi ve ark. 2003). DNA molekülünün doğrudan UV güneş ışığı (daha çok UVB dalga boyları) tarafından uyarılması komşu pirimidinler arasında dimerizasyon reaksiyonlarını başlatan modifikasyonlarla sonuçlanmaktadır. Bu fotokimyasal reaksiyonların ürünleri; siklobüton primidin dimerleri (CPD), primidin 6-4 primidon fotoürünleri (6-4PPs) ve Dewar izomerleridir. Hücreler UVB ışığına maruz kaldığında, sitozin metillenmesinin pirimidin bazlarındaki dimerlerin oluşumunu güçlü bir şekilde arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca, bu bölgelerin insan deri kanserlerinde *p53* gen mutasyonları için esas bölgeler olduğu da bilinmektedir. Protein-DNA çapraz bağlanması, 8-oxo-7,8-dihidroksiguanin gibi oksidatif baz hasarı ve tek zincir kırılmaları UV kaynaklı diğer DNA hasarlarındandır. Doğrudan DNA lezyonlarının uyarılması dışında kromoforların ışık fotonlarını absorbe etmesiyle, 7,8-dihidro-8-oksoguanin gibi reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bir başka UV kaynaklı DNA lezyonu ise tek zincir kırılmalarıdır (Yagura ve ark. 2011; Gruijl ve ark.2001).

1.2.4. Hücre döngüsü ve kanser

Hücre döngüsü, hücrelerin büyüme ve gelişmesini sağlayan karmaşık olaylar dizisidir. Kanser ise hasara veya mutasyona uğramış hücrelerin hücre döngüsüne devamına izin verildiği için bir anlamda hücre döngüsünün düzenlenmesinde meydana gelen hasarların (işlev bozukluklarının) ürünüdür. **Onkogenler** (örneğin *Her2/neu*, *Ras*, *c-Myc* gibi) ve **tümör baskılayıcı genler** (*p53* ve *Rb*) olmak üzere iki önemli gen grubu hücre döngüsünde ve dolayısıyla kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Mutasyonlar genellikle proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde oluşmaktadır. Proto-onkogenler

normalde hücre çoğalmasının farklı aşamalarında rol oynamaktadır ancak mutasyona uğradıklarında tümör gelişimini düzenlemektedirler (onkogen olarak isimlendirilirler). Benzer şekilde, tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu hücre döngüsü sürecinin inhibisyonunun engellenmesine ve böylece anormal hücre gelişimine sebep olmaktadır. Normal şartlar altında, büyüme düzenleyici mekanizmalar homeostazisi devam ettirmek için çalışmaktadır. Hücrede homeostazi; hücre çoğalması, gelişimin durdurulması (tutuklanma) ve apoptoz arasındaki denge tarafından düzenlenmektedir. Hücre gelişimi ve ölümü arasındaki dengenin bozulması hiperplazi ya da neoplaziye neden olabilmektedir (Foster 2008).

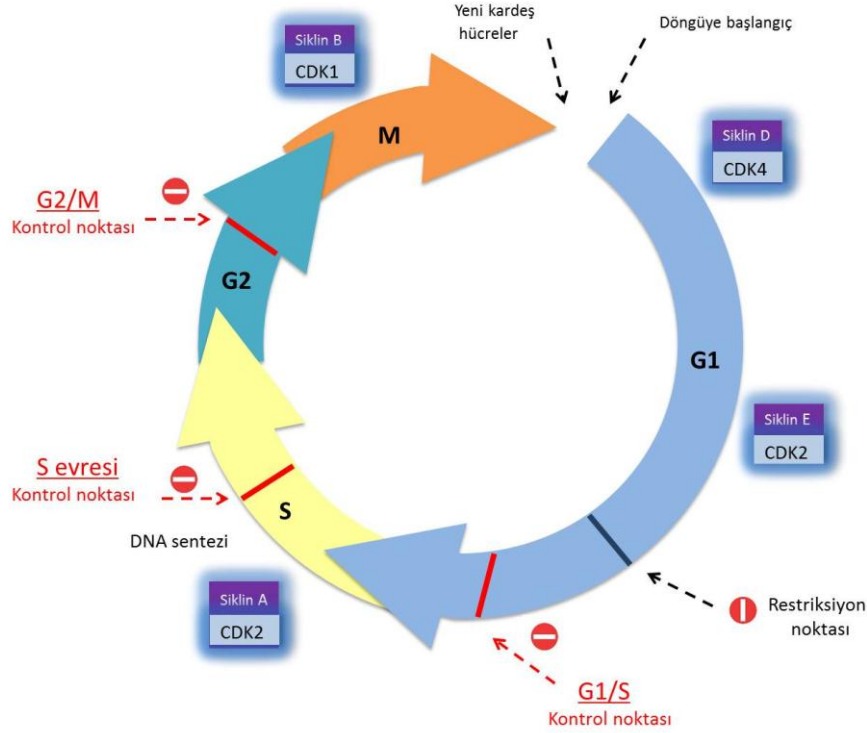
Hücre bölünmesi, mitoz (M) ve interfaz olmak üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. Mitoz (çekirdek bölünmesi), yavru kromozomların birbirinden ayrıldığı ve hücre bölünmesinin (sitokinez) gerçekleştiği evredir. İnterfaz ise hücre büyümesi ve DNA replikasyonunun gerçekleştiği, iki M evresi arasında yer alan evredir. G_1 , S ve G_2 evrelerinden oluşan interfaz evresi hücre döngüsünün % 90'nını kapsamakta ve 16-24 saat, mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir (Vermeulen ve ark. 2003; Cabadak 2008; Bury ve Cross 2003).

G_1 evresi; hücre için ya çoğalma ya da G_0 evresine giriş için kararın verildiği kritik bir evredir. Hücrenin metabolik ihtiyaçları en yüksek seviyede olduğu bu evrede, büyüme gerçekleşmekte ve DNA sentezi için hazırlık yapılmaktadır. **S evresi;** DNA replikasyonunun yapıldığı evredir. **G_2 evresinde** ise hücre büyümesi devam etmekte, mitoz için gerekli olan proteinler sentezlenmektedir (Bury ve Cross 2003). **Mitoz;** profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşmaktadır. Telofaz evresinde sitoplazmik bölünmenin tamamlanmasıyla iki kardeş hücre meydana gelmektedir (Vermeulen ve ark. 2003; Güneş 2003).

1.2.4.1 Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar

Hücre döngüsünün yönetici molekülleri siklin bağımlı protein kinazlar (Cdk) olarak adlandırılan enzimlerdir. Cdk'lar kendine özgü siklinler ile kompleks oluşturur ve sonrasında aktif bir kinaz tarafından fosforile edilirler. Siklin

düzenleyici birim ve Cdk'lar katalitik partnerleridir. Siklin-Cdk kompleksleri, DNA sentezini aktive etmekte, mitozla ilgili yapısal bileşenlerin oluşumunu sağlamakta ve hücreyi döngü boyunca götürecek özgün protein substratlarını fosforillemektedir (Tyson ve ark. 2002; Israels ve israels 2000).



Şekil 1.4. Hücre döngüsü evrelerinde Cdk/Siklin komplekslerinin aktivite bölgeleri ve hücre döngüsü kontrol noktaları (Kong ve ark. 2003)

Hücre döngüsü esnasında siklin protein seviyeleri artar ya da azalır ve bu yolla periyodik olarak siklin bağımlı kinazlar aktive edilmektedir. Hücre döngüsünün farklı evrelerinde farklı siklinler görev almaktadır (Şekil 1.4). Hücrenin G₁ evresinden S evresine geçişi siklin E ve siklin D ile kompleks oluşturan Cdk 2, Cdk 4, Cdk 6 ile sağlanmaktadır. Özellikle Cdk 2, Cdk 4 ve Cdk 6 ile birleşen D-tipi siklinler (siklin D1, D2, D3) G₁ evresindeki sınırlanma noktasında (R noktası) çok önemli rol oynamaktadırlar. Cdk 2/siklin E kompleksi ise G₁ evresinin sonraki döneminde S evresine geçişi sağlar ve DNA sentezini başlatır. Cdk 2/siklin A kompleksi DNA sentezinin başlamasında ve S evresinin tamamlanarak G₂ evresine geçişte rol oynamaktadır. G₂ evresinin geç ve M evresinin erken dönemlerinde siklin A/Cdk1 kompleksi mitozu giriş

düzenlemektedir (Çoğulu ve ark. 2007; Güneş 2003). Cdk'ların hücre döngüsündeki aktiviteleri bazı moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Siklinler, hücre döngüsünün farklı evrelerinde bir taraftan sentezlenirken diğer taraftan da yıkıldıkları için siklin / Cdk kompleksinin oluşumunu kontrol etmektedirler. Cdk'ların katalitik aktivite gösterebilmeleri için treonin rezidüsünde fosforillenmeleri gereklidir. Bu fosforilasyon CAK (Cdk'yı aktive eden kinaz) enzimiyle sağlanır. Oluşan Cdk/siklin kompleksi transkripsiyon ve DNA onarımında görev almaktadır. Cdk'lar bazı kinazlar tarafından threonin ve tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile inhibe edilmektedir. Cdk'nın teronin ve tirozin rezidülerinden fosforilasyonu Cdk'nın inaktivasyonuna sebep olmaktadır. (Vermeulen ve ark. 2003; Güneş 2003; Çoğulu ve ark. 2007; Cabadak 2008; Malumbres ve Barbacid 2001).

Cdk inhibitörleri (CKI); yalnız Cdk'ya ya da Cdk-siklin kompleksine bağlanarak Cdk aktivitesini düzenlemektedirler. INK4 ailesi; p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d) G₁ üyelerinden oluşmakta ve G₁ evresinde Cdk 4 ve Cdk 6 'ya bağlanarak kompleks oluşumunu durdurmaktadırlar. İkinci ailenin üyeleri; p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2)'dir (Vermeulen ve ark. 2003; Cabadak 2008).

1.2.4.2 Hücre döngüsü kontrol noktaları

Hücre döngüsü evrelerinin ilerleme süreci ve bir evreden diğerine geçişi **kontrol noktaları** olarak adlandırılan olayların doğru sırada sürdürülmesini sağlayan sensör mekanizmaları tarafından izlenmektedir. Eğer sensör mekanizmaları, anormal ya da kusurlu hücre döngüsü olaylarını tespit ederse, problem çözülene kadar, kontrol noktası yolakları tarafından hücre döngüsünün engellenmesini başlatacak olan efektörlere sinyal taşınmaktadır. Efektör proteinler, hücre döngüsü sürecini tersinir olarak durdurabilen Cdk inhibitörlerini içermektedir (Williams ve Stoeber 2012).

Hücre döngüsünde G₁-S geçişinde, G₂-M ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları bulunmaktadır.

G₁ kontrol noktası, hücrelerin DNA sentezi için yeterli büyüklükte olup olmadığı, DNA' da meydana gelen bir hasarın onarılıp onarılmadığı ve mitotik hücre bölünmesi için dış şartların uygun olup olmadığından emin olarak S evresine girişi kontrol etmektedir (Tyson ve ark. 2002).

G₁ evresinin geç safhasında görülen ve G₁'den S evresine geçişi sağlayan kontrol noktası sınırlanma noktası olarak (**Restriksiyon; R noktası**) adlandırılmaktadır. Büyüme ya da mitotik sinyallere cevaben hücreler G₀ evresinden G₁ evresine geçmektedir. Mitotik sinyallerin yokluğunda hücreler farklılaşmaya, apoptoza ya da sessiz evreye (G₀) giriş yapabilir. G₁ evresinin başlarında ya da G₀ evresinde retinoblastoma (Rb) proteininin fosforlanmamış formu, bir transkripsiyon faktörü olan E2F'ye bağlıdır. E2F hücre döngü olaylarında ve S evresinde görev yapan birkaç genin ekspresyonunu düzenlemektedir. Rb/E2F kompleksi, E2F tarafından düzenlenen gen transkripsiyonunu baskılamaktadır. G₁ evresinin başlangıcında siklin D ekspresyon seviyesi artırılmasıyla siklin D'ler Cdk 4 ve Cdk 6 ile birleşmektedir. Siklin/Cdk kompleks oluşumu Cdk'ların fosforillenmesi ve aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Aktif Cdk kompleksi retinoblastoma (Rb) proteinini fosforile eder. Rb'un Cdk 4/siklin D tarafından fosforillenmesi Rb'nin E2F'den ayrılmasına ve E2F'nin hedef genlerinin aktivasyonuna neden olur (Çoğulu ve ark. 2007; Israels ve israels 2000; Güneş 2003; Cabadak 2008).

G₂ kontrol noktası; DNA replikasyonunun tamamlandığından, DNA oluşabilecek yeni bir hasarın onarıldığından ve hücrenin bölünme için yeterli büyüklükte olduğundan emin olarak mitozu girişi kontrol etmektedir. Mitoz evresine giriş süreci, mitozu ilerleten faktör olarak da isimlendirilen (MPF) siklin B-Cdk 1 kompleksinin aktivitesine bağlıdır. Hücre, kromozom yoğunlaşmasına ve çekirdek bölünmesine gitmeden önce DNA'larının tamamen hasarsız olarak replike olduğundan emin olmalıdır. Eğer değilse, MPF'nin Wee 1 enzimi tarafından fosforillenmesi ile inhibe edilir ve hücre S-G₂ evresinde bekletilir (Tyson ve ark. 2002).

Metafaz kontrol noktası, metafaz-anafaz geçişini korumaktadır. Kohezinler parçalamadan önce kromozomların mitotik iğler üzerinde düzgün olarak dizilmesi, kardeş kromatidler ile zıt kutuplara bağlanmış olması

gerekmektedir. Kromozomlar toplanırken ya da dizilirken problemler meydana gelirse metafaz kontrol noktası mitotik çıkış işleminin aktivasyonunu engellemektedir (Tyson ve ark. 2002).

1.2.5. Onkogenler

Onkogenler, hücre çoğalmasının düzenlenmesinde gerekli olan ve “proto-onkogen” olarak adlandırılan genlerin değişime uğramış halleridir (Borrello ve ark. 2008). Onkogenlerin varlığı RNA tümör virüsleri üzerinde yapılan araştırmalar sonunda keşfedilmiştir. Rous sarkoma virüsü (RSV) hücrenin normal aktivitelerine müdahale eden *src* adında bir gen taşımaktadırlar. Bu gen, kanser olmayan hücrelere virüs tarafından aktarıldığında tümör oluşturmaktadır. Yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda enfekte olmayan hücrelerin genomunda *src* geninin varlığı tespit edilmiş, bu genin virüse ait bir gen olmadığı, viral genoma enfeksiyon esnasında katılmış olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra hücrelerin **proto-onkogenler** olarak adlandırılan, hücrelerin hayatta kalma, bölünme ve çoğalmaları için gerekli olduğu kadar normal aktivitelerini bozma ve malignan duruma itebilme potansiyeline de sahip bazı genlere sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır (Karp 2010; Dilsiz 2004). Normal hücrelerin kontrol dışı bölünmeden kaçınabilmesi için proto-onkogenlerin ifadeleri sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Kanserde, kontrolsüz hücre bölünmesi ve hayatta kalma becerisinin artışından proto-onkogenlerin mutasyonları sorumludur (Harrington 2011).

Bir proto-onkogen; mutasyonlar, kromozomal yeniden düzenlenmeler ve gen çoğaltımı gibi yapısal ya da düzenleyici değişikliklerle onkogene dönüşmektedir (Harrington 2011). Onkogenler çeşitli mutasyonlarla aktive edildiğinde, kodlanan proteinin transformasyon aktivitesini arttıracak şekilde yapısı değiştirilmektedir. Onkogenlerde birçok tipte mutasyon meydana gelmektedir (Croce 2008). Örneğin, *ras* proto-onkogeninde 12, 13 ve 61. kodonlarda meydana gelen mutasyonlar, sürekli hücre çoğalmasını uyaran bir proteinin devamlı aktif durumda kalmasına yol açmaktadırlar. *Ras* onkogeninde

meydana gelen nokta mutasyonu örneklerine akciğer, kolon ve pankreas kanserlerinde sıkça rastlanmaktadır (Osborne ve ark. 2004).

Kromozom inversiyonları ve translokasyonlar kanser hücrelerinde yaygın olan sitogenetik anomalilerdir (Croce 2008). B hücrelerinde görülen kanserlerde *c-myc* geni transloke olmakta ve meme, ovaryum, mide bağırsak kanserlerindeki ifade edilme seviyesi arttırılmaktadır (Gostissa ve ark.2009). Kronik miyeloid lösemide ise 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyon, Philadelphiya kromozomu olarak tanımlanmıştır. 9. ve 22. kollarda bulunan genlerin füzyonu sonucunda kimerik bir protein sentezlenmesi kronik lösemiye neden olan primer olay olarak belirtilmektedir (Nussbaum ve ark. 2005).

Onkogen aktivasyonu gen çoğaltımı yoluyla da olabilmektedir. Bir DNA segmentinin çoğaltılmasıyla, bu segmentte yer alan bir proto-onkogenin birçok yeni kopyası genoma eklenmektedir. *Myc*, *siklin D1*, *EGFR* ve *ras* gibi onkogenler küçük hücreli akciğer kanseri, meme, özofagus, serviks ve ovaryum kanserlerinde çoğaltılmaktadır (Croce 2008).

Onkogenler, proto-onkogenlerin protein ürünlerinin biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerine göre; büyüme faktörleri, sinyal çeviricileri, transkripsiyon faktörleri ve apoptoz düzenleyicileri şeklinde sınıflandırılabilirler (Borrello ve ark. 2008; Şevik 2012).

1.2.6. Tümör baskılayıcı genler

Onkogenlerin keşfedilmesi bu genlerin etkilerini engelleyebilecek ve tümör gelişimini durdurabilecek farklı bir sınıfın daha olabileceğini düşündürmüştür. Tümör gelişimini baskılayan genlerin varlığı, somatik hücre füzyonu ve kromozom ayrılması çalışmalarıyla ortaya çıkarılmış ve çok sayıda tümör baskılayıcı gen tanımlanmıştır (Sherr 2004).

Tümör baskılayıcı genlerde görülen mutasyonlar genellikle çekiniktir. Kromozomun bir allelinde mutasyon meydana geldiğinde, diğer sağlam olan allel büyüme engelleyici fonksiyonuna devam etmektedir. Sadece her iki allel de inaktif edildiğinde tümör baskılanması engellenmektedir (Krauss 2003).

Tümör baskılayıcı genler fonksiyonlarına göre iki grupta toplanabilmektedir.

1. Bekçi olarak adlandırılan tümör baskılayıcı genler; hücre büyümesini engelleyerek ya da apoptozu düzenleyerek doğrudan tümör oluşumunu engellemektedirler. Rb proteini, p53 proteini ve hücre döngüsü inhibitörü olan p16 proteini önemli bekçi proteinlerdendir.

2. Bakıcı olarak adlandırılan tümör baskılayıcı genler; tümör oluşumu üzerine doğrudan etkili değildirler. Bu tip genler hücre bütünlüğü koruma ve yaşamın sürdürülmesine yönelik görev yapmaktadırlar. Birçok bakıcı tipte genler, DNA onarımında rol alan proteinleri kodlayarak mutasyon oluşumuna engel olmaktadır (Campisi 2003; Krauss 2003).

Transkripsiyon faktörleri olan *TP53* ve *WT1*; hücre döngüsü düzenleyicileri olan *Rb* ve *p16*, bir fosfoinozidit fosfotaz olan *PTEN*, protein degradasyonunu düzenleyen bir protein olan *VHL*, hücre adezyon molekülü olan *E-kaderin*, *P53* aktivasyonunda görev alan *ARF*, DNA onarımında görev alan *BRCA-1* tümör baskılayıcı genler arasındadır (Karp 2010; Kopnin 2000).

Retinoblastoma (*Rb*); tümör baskılayıcı genler arasında ilk keşfedilen gendir. Yapılan çalışmalar ile *Rb* geninin çeşitli kanser tiplerinde seviyesinin azaltıldığı, mutasyonlara uğradığı ya da heterozigot kaybı gösterdiği tespit edilmiştir (Lai ve ark. 2012). Çocuklukta sıkça rastlanan, göz retinasında görülen bir kanserden *Rb* geni sorumludur (Karp 2010). Retinoblastoma göz tümöründe, *Rb* geninde ikinci allelin mutasyonu ya da delesyonla inaktivasyonu, genin fonksiyon gösterememesine ve tümör gelişimine neden olmaktadır (Krauss 2003).

Rb, hücreyi hücre döngüsünü, hücre yaşlanmayı, farklılaşmayı, apoptozu ve kromozomal bütünlüğü düzenleyerek tümör oluşumundan korumaktadır (Lai ve ark. 2012). *Rb* geninin ürünü olan retinoblastoma proteini (pRb), hücre döngüsünde mitojenik ve anti-mitojenik sinyallerin transkripsiyonal seviyede dönüşümünde fonksiyon göstermektedir. pRB bu fonksiyonu fosforilasyon durumuna göre yönlendirmektedir. Proteinin düşük seviyede fosforile durumu E2F ile birlikte hücre döngüsünün devamı için gerekli olan ürünlerin baskılanmasına sebep olmaktadır. Fazla seviyede fosforilasyonu ise tam tersine bu genlerin etkisini aktifleştirmektedir (Krauss 2003).

1.2.6.1 p53 Geni

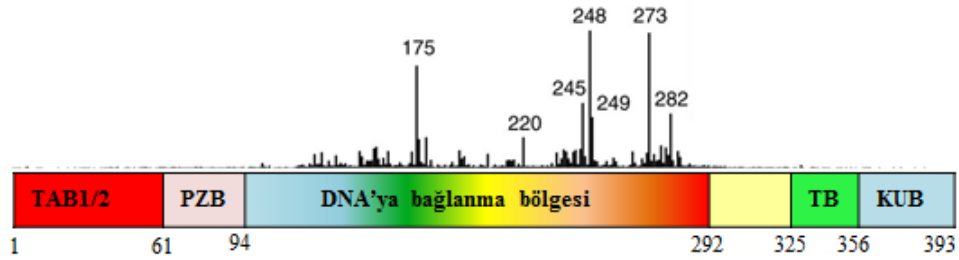
p53 geni ilk olarak simian virüs (SV40) ile transforme edilmiş hücre lizatlarında keşfedilmiştir. Transforme hücrelerde *p53* ile onkogenik potansiyeli olan SV40 büyük T antijenlerinin kararlı bir kompleks oluşturduğu gösterilmiş ve bir onkogen gibi tümör gelişimini teşvik ettiği düşünülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda ilk olarak keşfedilen *p53* proteininin mutant *p53* olduğu anlaşılmış ve yabancı tip *p53* proteininin tümör baskılayıcı rolü ortaya konmuştur. *p53* proteinini kodlayan gen *TP53* (tümör protein 53) olarak adlandırılmıştır (Ozaki ve Nakagawara, 2011; Koçak ve ark. 2011).

p53 proteini kanserli hücrelerin büyüme ve hayatta kalma potansiyelini önleyecek stres yanıt yollarında önemli rol oynamaktadır. DNA hasarı, telomer aşınması, onkogen aktivasyonu, hipoksia, normal büyüme ve yaşamsal sinyallerinin kaybı gibi birçok stres tipi *p53*'ü aktive edebilmektedir. Bu stres sinyalleri, tümör gelişiminin başlangıcından metastaza kadar bir tümöröenez aşamasında olan hücrede ortaya çıkabilmektedir. Bu yüzden *p53* malignant sürecinin çeşitli noktalarında tümör hücrelerinin büyümesinin önlenmesi açısından önem taşımaktadır ve *p53* fonksiyon kaybının tümör gelişiminde önemli bir etkisi bulunmaktadır (Ryan ve ark. 2001).

İnsan kanserleri üzerinde yapılan çalışmalar *p53*'ün tümör baskılanmasındaki temel rolünü ortaya koymuştur (Brady ve Attardi 2010). *TP53* geni insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan genlerden birisidir (Suzuki ve Matsubara 2011). Yaklaşık olarak insan tümörlerinin yarısı *TP53* geninin her iki allelinde nokta mutasyonları ya da delesyonlar içermektedir (Karp 2010). *p53* geninde meydana gelen mutasyonlar birçok kanser türüne kalıtsal eğilim ile karakterize olan Li-Fraumeni sendromu olarak adlandırılan bir hastalığa neden olmaktadır (Krauss 2003).

1.2.6.2 p53 geni yapısı

İnsan p53 proteini 53 kDa ağırlığında bir nükleer fosfoprotein olup, 17. kromozomun kısa kolunda bulunan, 11 ekzon ve 10 intron içeren bir gen tarafından kodlanmaktadır. Bu gen, iki üyesi daha bulunan ve evrimsel olarak oldukça korunmuş bir gen ailesine aittir (Bai ve Zhu 2006). Yabani tip p53 proteini 393 aminoasitten oluşmakta, çeşitli yapısal ve fonksiyonel bölgeler içermektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5: p53 proteininin moleküler yapısı (Joerger ve Fersht 2008). TAB1/2: transkripsiyonal aktivasyon bölgesi, PZB: Prolin zengin bölge, TB: tetramerizasyon bölgesi, KUB: karboksi-ucu bölgesi

p53 proteinin N-ucu; transkripsiyonal aktivasyon bölgesi (TAD) ve prolin aminoasiti bakımından zengin bir bölgeden oluşmaktadır. Transkripsiyonal aktivasyon bölgesi TAD1 ve TAD2 olmak üzere 2 alt bölgeden oluşmaktadır. Bu 2 alt bölge, negatif düzenleyicilere, transkripsiyonal koaktivatörlere ve transkripsiyonal mekanizma bileşenlerine bağlanmaktan sorumludur (Natan ve ark. 2011; Bai ve Zhu 2006). Bu bölge aynı zamanda Mdm2 ile etkileşim oluşturarak p53 kararlılığının sağlanmasında önemlidir. Prolin aminoasiti bakımından zengin bölge ise $-SH_3$ taşıyan sinyal transdüksiyon moleküllerine bağlanmaktadır (Cheah ve ark. 2001).

p53 proteinin çekirdek merkezi; diziye özgün bağlanma için gerekli olan DNA bağlanma bölgesinden oluşmaktadır. İnsan kanserlerinde meydana gelen p53 mutasyonlarının çoğunluğu bu bölgeyi içermektedir ve DNA ile bağlantıda gerekli olan kritik rezidülerin kaybı ya da yapısal bir değişiklik özgün olarak DNA bağlanmasının engellenmesi ile sonuçlanmaktadır (Bai ve Zhu 2006; Cheah ve ark. 2001).

p53 proteinin C-ucu; oligomerizasyon ya da tetramerizasyon bölgesi, düzenleyici bölge, çekirdekte yerleşme ve çekirdekten taşınma sinyal dizilerinden oluşmaktadır (Bai ve Zhu 2006). Hedef DNA'ya bağlanma, tetramer yapıdaki p53 molekülünün DNA ile etkileşime girmesiyle gerçekleşmektedir. Bu tetramerizasyon dizisiye özgü DNA bağlanma bölgesinin yanında bulunan tetramerizasyon bölgesi ile kontrol edilmektedir (Cheah ve ark. 2001; Brady ve Attardi 2010). p53'ün C- ucunun son 30 aminoasiti negatif düzenleyici fonksiyona sahiptir. p53'ün DNA'ya özgün bağlanma ve transkripsiyonal aktivitesini engellemektedir (Wang ve ark. 2003). Düzenleyici bölge, proteozomlar tarafından yıkımı için asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi modifikasyonlara uğramaktadır (Viadiu 2008).

1.2.6.3 p53 proteininin hücresel fonksiyonları

Yabani tip p53 hem hücre seviyesinde hem de tüm organizmada biyolojik yanıtları başlatacak çok işlevli bir transkripsiyon faktörüdür (Bai ve Zhu, 2006; Yılmaz ve Altunok 2011). p53 proteini, güçlü stres sinyallerine maruz kalan hücrelerde tamir edilemeyecek kadar hasarlı ya da kanserli hücrelerin seçilip ayrılmasını sağlayarak apoptoza ya da yaşlanmaya sürüklemektedir. Düşük seviyede stres şartları altında ise p53 hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı ve antioksidan protein üretimi gibi koruyucu ve hayatta kalmaya yönelik yanıtlar oluşturmaktadır. Böylelikle, onarılabılır hasara uğramış hücrelerde canlılığın sürdürülmesini ve genom bütünlüğünü sağlamaktadır (Brady ve Attardi 2010).

p53 ve hücre döngüsü kontrol noktaları: Normal koşullar altında, hücrenin G₁ evresinden çıkıp S evresine girebilmesi için pRb'nin Cdk2 tarafından fosforile edilmesi gereklidir. Fosforile pRb'ye bağlanan ve S fazına giriş için gerekli olan genlerin ifade edilmesini uyaran transkripsiyon faktörü E2F salınmaktadır. DNA hasarı sonrasında yabani tip p53 miktarında bir artış görülmektedir. Hücresel strese cevaben p53, G₁ evresinin durdurulmasında ilk aracı olan p21^{waf1/Cip1} seviyesini arttırmaktadır. p21^{waf1/Cip1}, siklin/Cdk kompleksini baskılamakta ve pRb oluşumuna izin vermektedir. Bu durumda E2F

salınamamakta ve S fazına geçiş engellenmektedir. (Cheah ve ark. 2001; Ozaki ve Nakagawara 2011; Bai ve Zhu 2006).

Hücrelerin G₂ evresinden mitozaya giriş süreci siklin B1/Cdk2 kompleksinden oluşan MPF (maturation-promoting factor) tarafından yönlendirilmektedir. p53; G₂/M durdurulmasını büyük ölçüde bu kompleksin fonksiyonunu bozarak indüklemektedir. Özellikle p53, DNA hasarından sonra mitozu düzenleyen bir fosfotaz olan Cdc25'i baskılamaktadır. Aynı zamanda 14-3-3s, p53'ün hedef genidir, DNA hasarından sonra ifadesini arttırmaktadır. 14-3-3s, DNA hasarından sonra siklin B1/Cdk2 kompleksinin uygun şekilde çekirdekte yerleşimini engellemektedir. p53 tarafından indüklenen Gadd45, Cdk2'nin kinaz aktivitesini engelleyerek siklin B1/Cdk2 kompleksinin aktivitesini engellemektedir (Zilfou ve Lowe 2009; Giono ve Manfredi 2006).

P53 ve apoptoz: Hücrel bir bekçi olarak p53'ün görevlerinden birisi de hücrel stresi takip etmek ve gerektiğinde apoptozu uyarmaktır. Stres faktörleri dokularda büyük ve tamir edilemeyen bir hasar oluşturdıklarında, p53 apoptozu başlatabilmekte ve böylece hasarlı hücreler elenebilmektedir (Bai ve Zhu 2006). p53, hücrel stres sonucunda apoptotik yanıtı başlatacak birçok geni transaktif etmektedir. Bu genler arasında; Bax, Puma, Noxa ve Bid gibi iç yolda mitokondriyal zar depolarizasyonunu sağlayan Bcl-2 ailesi üyeleri, apoptotik proteaz aktif edici faktör (Apaf-1) ve dış apoptotik yolağın bileşenleri Fas/CD95, ölüm reseptörü 4 ve 5 (DR4 ve DR5) bulunmaktadır. Aynı zamanda, p53 doğrudan BclXL ve Bcl-2 proteinlerine bağlanarak inhibe edebilmektedir. Daha sonra sitokrom c salınımı ve ardından da kaspaz şelalesi başlatılabilmektedir (Shu ve ark. 2007).

p53, iç ve dış apoptotik yolların çekirdek bileşenleri dışında, apoptozla ilişkili PERP ve PIDD (p53 uyarımlı ölüm bölgesi içeren protein) gibi diğer genleri de aktif etmektedir. Çoğu durumda, bu genler promotor bölgelerinde p53 yanıt elemanları içermekte ve fazla ya da düşük seviyede ifade olduklarında apoptozu düzenleyebilmektedirler (Fridman ve Lowe 2003). p53'ün bu nükleer aktivitelerine ilaveten, transkripsiyondan bağımsız bir şekilde apoptozu uyarabildiği sitozolik aktiviteleri de vardır. Özellikle, iyonize ışınlar gibi çeşitli ölüm sinyallerine cevaben p53 hızlıca mitokondride yerleşebilmektedir.

Mitokondride, mitokondriyal dışsal zar geçirgenliğini (MOMP) uyarmakta, böylece mitokondriyal zarlar arası alandan pro-apoptotik faktörlerin salınımına izin verilmektedir (Zilfou ve Lowe 2009; Fridman ve Lowe 2003).

P53 ve DNA onarımı: P53 aracılı DNA onarımı genomik kararlılığın sürdürülmesinde önemli bir faktördür. p53'ün DNA onarımında nükleotid çıkarma onarımı (NER), baz çıkarma onarımı (BER), homolog olmayan uçların bağlanması (NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HR) gibi çeşitli tiplerde DNA onarımında gerekli olduğu belirtilmiştir (Shu ve ark. 2007). p53'ün C-ucu; doğrudan tek zincirli DNA, çift zincir kırıkları gibi farklı formlarda hasarlı DNA'ya bağlanabilmektedir. Aynı zamanda DNA zincir transferi ve 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi p53'ün DNA onarım fonksiyonunda yer almaktadır (Balint ve Vousden 2001).

P53 ve hücre yaşlanması: Hücresel yaşlanma sürekli bir hücre döngüsü durdurulması olarak tanımlanmaktadır. Yaşlı hücreler metabolik olarak aktif kalmakta ancak hücre boyutunda genişleme, kromotin yoğunlaşması, gen ifadesinde değişiklikler, yaşlanma ilişkili β -galaktosidaz seviyesinde artış ile karakterize edilen morfolojik, fizyolojik olarak birtakım farklı özellikler kazanmaktadırlar. Yaşlanma; telomer kısalması, onkogenik uyarıcılar, iyonize ışınlar ve DNA'ya hasar veren ajanlar tarafından uyarılmaktadırlar. (Martinez-rivera ve Siddik 2012).

Yaşlanma durumunda p53'ün 2 esas yolak tarafından kontrol edildiği belirtilmektedir. Birincisi ATM/ATR ve Chk1/Chk2'nin aracılık ettiği DNA hasar yanıt yolağıdır. İkinci yolak ise ARF proteini aracılığıyla hareket etmektedir (Ben-porath ve Weinberg 2005)

P53, ATM/ATR ve Chk1/Chk2 tarafından fosforillenerek aktif duruma getirilebilmektedir ya da murin double minute 2 onkoproteini (Mdm2 ya da insanlarda Hdm2), p19^{ARF} tarafından inhibe edilerek p53 seviyesi arttırılabilmektedir. P21, p53 tarafından aktive edilen hücre döngüsünün durdurulmasında rol oynayan bir proteindir. p53/p21 yolağının yaşlanmanın indüklenmesinde önemli bir rolü bulunmaktadır (Larsson 2005). p21'in yanında PML, PAI-1 ve DEC1 gibi moleküler belirteçlerin de p53 aracılı yaşlanmada rol aldıkları gösterilmektedir (Qian ve Chen 2011).

1.2.6.4 P53 kararlılığının düzenlenmesi

p53, hücre büyümesinin kuvvetli bir baskılayıcısı olduğundan, normal bir hücre gelişimi için fonksiyonları kontrol altında tutulmalıdır (Ryan ve ark. 2001). p53 fonksiyonunun düzenlenmesi p53 transkripsiyonu, translasyonu, protein kararlılığı ve translasyon sonrası düzenlenmeleri içeren çeşitli mekanizmalarla kontrol edilmektedir (Brate ve Giannakakou 2003). p53; fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon ve ubikuitinasyon gibi aktivitelerini etkileyen çeşitli translasyon sonrası düzenlenmelere uğramaktadır. p53 ubikuitinasyonu p53'ün kontrolünde esas mekanizma olarak gösterilmektedir. p53; Pirh2, COP1, ARF bağlanma proteini ve E6AP gibi çeşitli E3 ligazlar tarafından modifiye edilebilmektedir. Ancak Mdm2 ya da insanlarda Hdm2, p53 aktivitesinin gerekli olmadığı durumlarda p53 proteininin düşük seviyede tutulmasını sağlayan anahtar negatif düzenleyicisidir (Coutts ve ark. 2009; Brady ve Attardi 2010). Mdm2, p53 aktivitesini p53'ün transaktivasyon bölgesine bağlanarak, ubikuitinasyon için p53'ü hedefleyerek, p53 asetilasyonunu engelleyerek ve p53'ün stoplazmaya giriş çıkışını sağlayarak çeşitli yollarla engellemektedir (Balint ve Vousden 2001). Bununla birlikte, p53 de Mdm2 geninin transkripsiyonunu aktive etmektedir (Çefle, 2003). Normal fizyolojik şartlarda, bu 2 protein arasındaki oto-düzenleyici mekanizma, p53'ün fonksiyonlarını kontrol altında tutmak için p53'ü düşük seviyede tutulmasını sağlamaktadır (Zhang ve ark. 2004). Mdm2, p53 için bir ubikuitin ligaz olarak fonksiyon göstererek ubikuitinasyonu sağlamaktadır, p53'ün proteozomlar tarafından tanınmasına ve parçalanmasına yol açmaktadır (Vousden ve Prives 2009). p53 proteini, hücrel stres sinyallerine yanıt olarak kararlı hale gelen kısa ömürlü bir proteindir (Shu ve ark. 2007). Çoğu durumda, p53'ün uyarılması için Mdm2 fonksiyonunun engellenmesi gereklidir. Mdm2 fonksiyonunun engellenmesi stres sinyaline bağlı olarak çeşitli bağımsız yollar tarafından sağlanmaktadır.

Mdm2 tarafından uyarılan yıkımı düzenleyen mekanizmalar;

- Mdm2 seviyesinin doğrudan baskılanması,
- p53 ve Mdm2'nin translasyon sonrası düzenlenmesi,
- Mdm2 fonksiyonunun p53 ya da Mdm2'nin hücre içi lokalizasyonunun düzenlenmesini engelleyen proteinlerin seviyesinin arttırılması,
- Mdm2 indüklü yıkımı düzenleyen mekanizmalardır (Ryan ve ark.2001).

P53 ve Mdm2 proteinleri arasındaki etkileşim p53'ün Mdm2'ye bağlandığı bölgenin fosforillenmesiyle bozulabilmektedir. Bu bölgedeki rezidülerin fosforillenmesine Chk1, Chk2, ATM ve ATR gibi genetik hasarla aktive edilen kinazlar aracılık etmektedirler. Fosforillenme ile p53'ün mdm2'ye bağlanması engellenerek kararlılığı sağlanmış olmaktadır (Vousden ve Prives 2009). pRb, p19^{ARF} (insanda P14^{ARF}) ve MdmX gibi çeşitli proteinler p53-Mdm2 bağlanmasını etkileşimini doğrudan p53'e ya da Mdm2'ye bağlanarak engellemektedirler (Brooks ve Gu 2003). p53'ün Mdm2-bağımlı yıkımında p14^{ARF} (ya da ARF) önemli bir düzenleyicidir (Chumakov 2007). *Ras*, *myc* gibi onkogenlerin aktivasyonu üzerine ARF seviyesi arttırılmaktadır (Di Cintio ve ark. 2010). ARF proteini Mdm2'ye bağlanır ve p53'ün ubiquitilasyonunu ve yıkımını önlemektedir. ARF geninin transkripsiyonu E2F1 ve B-katenin transkripsiyon faktörleri tarafından aktive edilir ve p53'ün kendisi tarafından baskılanır (Chumakov 2009).

1.2.6.5 Hücrede p53 proteininin yerleşimi

p53 fonksiyonunun düzenlenmesi için p53'ün kararlılığının yanında hücredeki yerleşiminin de kontrol altında tutulması gerekmektedir. p53 proteininin çekirdekte yerleşimi transkripsiyonel yanıtta önemli bir rol oynamaktadır (Vousden 2002). Fibroblastlarla yapılan çalışmalarda p53'ün çekirdeğe taşınmasının hücre döngüsüyle bağlantılı olduğu gösterilmektedir. G₁ evresinde yeni sentezlenen p53 proteini sitoplazmada biriktirilmekte, daha sonra G₁/S evresi geçişinde çekirdeğe giriş yapmaktadır ve son olarak S evresinde sitoplazmaya geri dönmektedir (Millau ve ark. 2009). p53'ün çekirdek ve

sitoplazma arasında hızlıca taşınabildiği Harms ve Chen tarafından bildirilmiştir. Tetramerik p53, nüklear pordan pasif olarak difüze olabilmek için oldukça büyük olduğundan, nükleo-sitoplazmik geçişin çekirdekten taşınma ve çekirdekte yerleşme sinyalleri tarafından kolaylaştırıldığı gösterilmiştir (Harms ve Chen 2006). p53 proteini C ucunda 3 adet çekirdekte yerleşme sinyaline (NLS: nüklear lokalizasyon sinyali) ve bir çift de çekirdekten taşınma sinyaline (NES: nüklear export sinyali) sahiptir. Böylelikle; p53'ün NLS VE NES mekanizmaları ile doğrudan etkileşimi sonucunda çekirdek ve sitoplazma arasında gidip gelmektedir (Michael ve Oren 2003). Mdm2, p53'ün sitoplazma ve çekirdek arasında translokasyonunun düzenlenmesiyle 2 yolla bağlantılıdır. Mdm2, çekirdekte p53 ile etkileşime girerek yıkımı için sitoplazmaya gönderebilmekte ya da p53'ün çekirdekte ubiquitinasyonunu sağlayarak çekirdekten taşınım sinyallerini aktif hale getirebilmektedir (Liang ve Clarke 2001). p53 molekülleri arasındaki etkileşimler de çekirdekten taşınmada önemli rol oynamaktadır. P53 tetrameri arasındaki bağlantılar NES'i örtülemekte ve p53 taşınmasını engellemektedir. p53 dimerler halindeyken ise NES baskıdan kurtulmakta ve sitoplazmaya taşınım sağlanmaktadır (Millau ve ark. 2009).

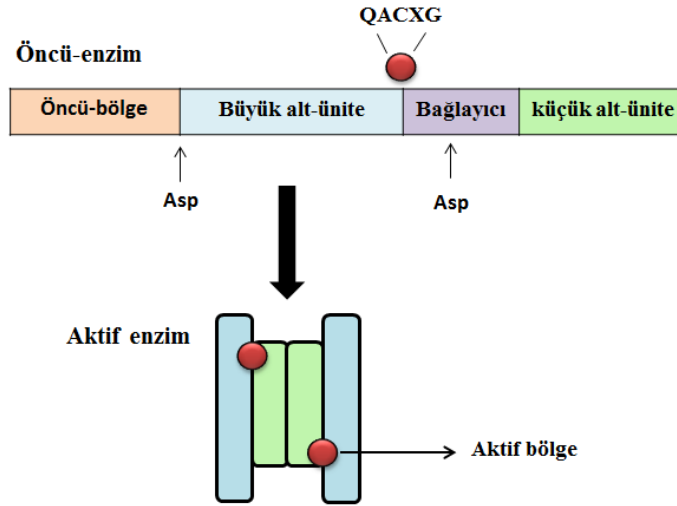
1.3. Apoptoz

Genel olarak canlı organizmalarda nekroz ve apoptoz olmak üzere iki ana hücre ölüm mekanizması vardır. Nekroz kontrolsüz ve pasif bir şekilde, toksik tehditler ya da fizyolojik hasarlar gibi hücrel yaralanmalara yanıt olarak hücrelerin patlamasıyla sonuçlanan bir ölüm şeklidir. Nekrotik ölüm, plazma zarının ve organel bütünlüğünün bozulması, hücrel içeriklerin ve pro-inflamatuar moleküllerin salınımıyla hücrenin etrafında inflamasyon gelişimi, hücrenin büyümesi ve şişmesi gibi morfolojik özellikler ile karakterizedir. Buna karşın apoptoz; aktif, metabolik ve birçok hücrel sinyal yolları tarafından düzenlenen bir intihar mekanizmasıdır (Wu ve ark. 2001; Edinger ve Thompson 2004; Yıldırım ve ark. 2007). Apoptoz; büyüme, gelişme ve immün cevabın düzenlenmesi, organizmada gereksinim duyulmayan ya da anormal hücrelerin yok edilmesinde temel bir rol oynayan oldukça organize bir ölüm şeklidir (Huang ve

ark. 2011). Organizmada apoptoz mekanizması bir denge unsuru olduğundan uygun bir şekilde gerçekleşmelidir. Apoptoz mekanizmasında meydana gelen fonksiyonel bozukluklar organizmada birçok patolojik duruma, ölümcül düzensizliklerin oluşumuna ve viral enfeksiyonların yayılımına sebep olabilmektedir. Uygun olmayan apoptoz ya da apoptoz oranının artması; AIDS, nörodejeneratif ve iskemik hastalıklar, hepatit C enfeksiyonu, insülin bağımlı diyabet, aterosklerozis gibi düzensizliklere sebep olmaktadır. Apoptoz oranının azalması ise kansere ve otoimmün hastalıklara yol açmaktadır (Ulukaya ve ark. 2011; Papaliagkas ve ark. 2007; Atunkaynak ve Özbek 2008).

1.3.1. Kaspazlar

Kaspazlar, programlı hücre ölümü, çoğalması ve inflamasyonunda görev alan hücre içi proteazlardır (Pop ve Salvesen 2009). *C. elegans*'ın Ced-3 geninin kodladığı bir sistein proteaz, insan interlekin-1 beta dönüştürücü enzimi (ICE) ile benzerlik göstermektedir. ICE'nin memeli hücrelerinde apoptozu uyardığı gösterilmiş ve kaspaz-1 olarak adlandırılmıştır. Memeli kaspaz-1 enzimi ve CED-3 arasındaki benzerlik memelilerde birçok kaspaz ailesi üyelerinin de keşfedilmesine olanak sağlamıştır (Li ve Yuan 2008). Günümüze kadar 14 memeli kaspazı tanımlanmıştır. Kaspazlar, hücre içinde etkin olmayan öncüller, ya da ön kaspazlar (zimojen) şeklinde sentezlenirler ve bir zincirdeki diğer kaspazlar tarafından kesilerek etkinleşirler (Alberts ve ark. 2007; Li ve Yuan, 2008). Kaspazlar (C-Asp-ase; C:sistein, Asp: aspartik asit, -ase: kesici enzim eki), aktif merkezlerinde sistein amino asidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden keserler (Yıldırım ve ark. 2007).



Şekil 1.6. Kaspazların yapısı ve aktifleşme mekanizması (Regula ve Kirshenbaum 2005)

Kaspazlar, N ucunda çeşitli uzunlukta bir pro-domeyn, bir büyük alt ünite (p20) ve C ucunda bir küçük alt ünite (p10) içermektedir (Şekil 1.6). (Duprez ve ark. 2009). P20 alt ünitesi evrimsel olarak korunmuş pentapeptit sekansı içeren bir aktif bölge içermektedir (Li ve Yuan 2008). Kaspazların N ucu, ön bölge (prodomeyn), apoptotik sinyallerin transdüksiyonu için gerekli olan ölüm bölgeleri süper ailesi olarak adlandırılan uzun yapısal motifler içermektedir. Ölüm bölgeleri (DD) TNF reseptör ailesi üyeleridir. Ölüm bölgesi, ölüm efektör bölgesi (DED) ve kaspaz toplayıcı bölge (CARD) olmak üzere 2 alt bölge içermektedir (Chowdhury ve ark.2008). Pro-kaspazların proteolitik kesilme ile aktivasyonu büyük ve küçük alt üniteyi ayırır ve ön bölgeyi uzaklaştırır (Li ve Yuan 2008). Kaspazların büyük ve küçük alt üniteleri bir heterodimer yapısını ve iki heterodimer de enzimatik olarak aktif bir tetramer yapısını oluşturmaktadır (Fan ve ark. 2005).

Fonksiyon, yapı ve substrat özgünlüğü temel alındığında insan kaspazları 3 grupta sınıflandırılabilir (Alenzi ve ark. 2010).

İlk grup, inflammatuar kaspazlardır. Kaspaz-14 ile sitokin aktivasyonunda gerekli olan kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 bu gruba girmektedir.

İkinci grup başlatıcı kaspazlardır ve uzun prodomeynle karakterizedirler. DED domeyni (kaspaz-8 ve kaspaz-10) ya da CARD bölgesi (kaspaz-2 ve kaspaz-9; CED-3) içermektedirler.

Üçüncü grup, efektörler ya da uygulayıcı kaspazlardır, kısa ön bölge içermektedir ve iç kaynaklı enzimatik aktiviteleri yoktur. Kaspaz-3, 6 ve 7 efektör kaspazlar olarak bilinirler. Effektör kaspazlar DNA fragmentasyon faktör 45 (DFF 45), poly-(ADP-riboz) polimeraz (PARP) gibi bilinen apoptotik substratların kesilmesinden sorumludur (Oliver ve Vallette 2005; Lawen, 2003; Rastogi ve Sinha 2009; İnci ve ark. 2009). Apoptoz esnasında kaspazlar, başlatıcı kaspazların aktivasyonundan uygulayıcı kaspazların aktivasyonuna doğru hiyerarşik bir kaskada girmektedirler (Alenzi ve ark. 2010).

Başlatıcı kaspazlar inaktif monomerlerdir ve homodimerizasyon ile aktive olmaktadır. Apoptoz sinyali ile uyarılan bir hücrede adaptör proteinler aracılığıyla başlatıcı kaspazların aktivasyonları tetiklenmektedir. Adaptör proteinler kaspaz-8 ve 10'un DED, kaspaz-1, 2 ve 9'un CARD bölgelerine özgün olarak bağlanmaktadır. Kaspaz yoğunluğunda bölgesel bir artış meydana gelmekte ve dimerizasyon ile aktivasyon oluşturulmaktadır. DISC kaspaz-8 ve 10'u, apoptozom kaspaz-9'u, PIDDom da kaspaz-2'yi aktive eden protein kompleksleridir (Pop ve Salvesen 2009; Rastogi ve Sinha, 2009; Yıldırım ve ark. 2007).

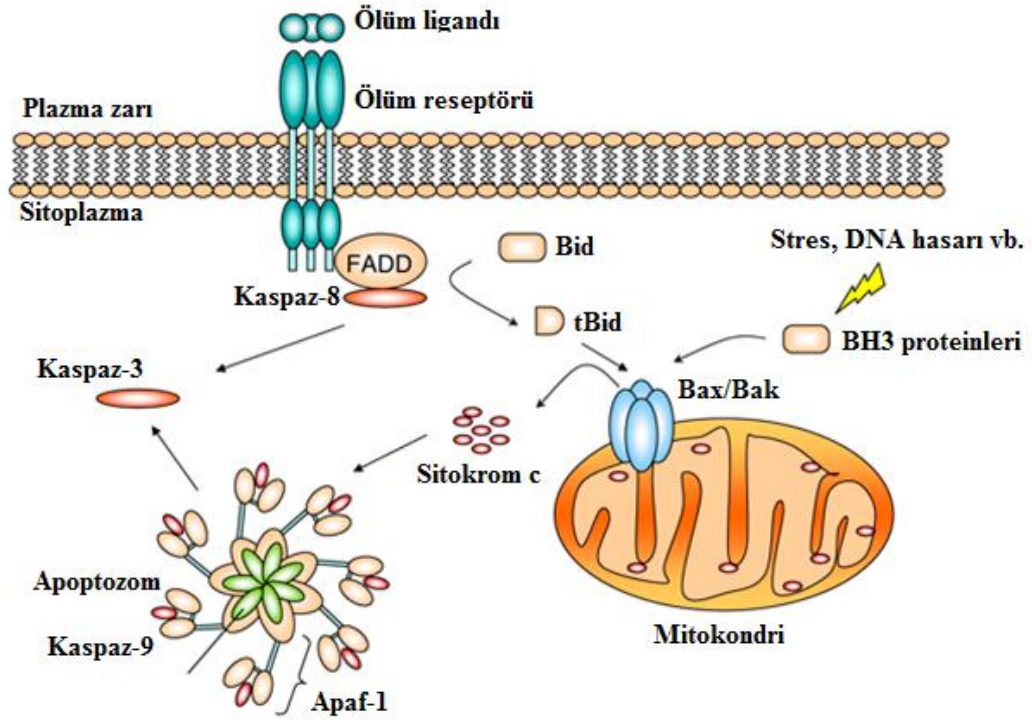
Uygulayıcı kaspazlar, sitozolde inaktif dimerler halinde bulunmaktadır. Apoptotik uyarıyı takiben, uygulayıcı pro-kaspazların büyük ve küçük alt üniteleri başlatıcı kaspazlar tarafından kesilmesiyle aktif enzimlere dönüştürülmektedir. Kesilme sonrasında enzimin aktif bölgesi yapısal değişiklikler geçirerek substratlarına ulaşılabilir hale gelmektedir. Kaspaz-3, apoptoz esnasında birçok hücrel substratı kesen esas uygulayıcı kaspazlardandır (Alenzi ve ark. 2010). Uygulayıcı kaspazlar bir kez aktive edildiğinde, hücre ölümüne neden olan hücrel hedeflerin proteolitik yıkımından sorumludurlar (Bao ve Shi 2007).

1.3.2. Apoptoz mekanizmaları

Esas olarak iç ve dış olmak üzere 2 apoptotik yol belirtilmektedir. Bu 2 yola ilave olarak, perforin/granzim A ya da B'yi içeren bir yol daha tanımlanmıştır. Granzim A-uyarımli apoptoz; tek zincir DNA hasar sonucunda meydana gelen kaspaz aktivasyonundan bağımsız bir yoldur (Rastogi ve Sinha

2009; Eröz ve ark. 2012). Gelen uyarının türüne göre hücrenin verdiği yanıt değişmektedir (Yıldırım ve ark. 2007). Apoptozu uyaran faktörler hücre içi ve hücre dışı olarak sınıflandırıldığında; hücre dışı faktörler ölüm reseptörleri ya da granzim/perforin sistemi yoluyla hareket etmektedir. Hücre içi faktörler ise mitokondriyal aktivasyona neden olmaktadır. Mitokondriyal aktivasyon aynı zamanda hücre dışı faktörler tarafından da başlatılmaktadır. Dolayısıyla mitokondri apoptozda temel bir rol oynamaktadır (Ulukaya ve ark. 2011).

Apoptozun dış yolağı; reseptöre özgü pro-apoptotik molekül ya da ligandlar tarafından aktiveleştirilen hücre yüzeyinde bulunan “ölüm reseptörleri” ile başlatılmaktadır. Ölüm reseptörleri, TNFR-1, Fas/CD95 ve TRAIL reseptörleri olan DR-4 ve DR-5’i içeren tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen süper ailesine aittir (O’Brien ve Kirby 2008; Singh 2010). Fas ligandı ya da TNF gibi bir ölüm faktörü ile ölüm reseptörü bağlandığı zaman, reseptörler yapısal değişikliğe uğramakta ve sinyali hücre içine iletmek üzere oligomerize olmaktadır. Bu yapısal değişiklik, reseptörlerin sitoplazmik ucunda yerleşmiş olan ölüm bölgelerinin FADD (Fas ilişkili ölüm bölgesi) ve TRADD (TNF reseptör ilişkili ölüm bölgesi) gibi hücre içi adaptör proteinlerine bağlanmalarına imkan sağlamaktadır (Şekil 1.7). Adaptör proteinlerinin görevi, ölüm sinyalini reseptörden kaspazlara iletmektir. Başlatıcı kaspaz olarak bilinen Kaspaz-8, reseptör ve apoptotik proteazlar arasındaki ilk bağlantıdır. Bu nedenle, dış yolak için anahtar rol oynamaktadır. Ölüm ligandı reseptör ve adaptör proteinden oluşan bu kompleks yani öldürücü sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılmaktadır (O’Brien ve Kirby 2008; Pecorino 2008 ; Singh ve ark. 2010). Aktif kaspaz-8 apoptotik süreci iki yolla sürdürmektedir: Doğrudan yol ile kaspaz 8 kaspaz 3’ü aktiveleştirir. Kaspaz-3 DNA fragmentasyon faktörü 45’i (DFF 45), DFF 40’a çevirerek DNaz aktivitesi kazandırmakta ve çekirdekte kromatin yoğunlaşması meydana gelmektedir. Dolaylı yolda ise pro-apoptotik protein olan Bid kaspaz-8 tarafından aktiveleştirilmektedir. Bid (tBid) mitokondriye taşınmakta ve mitokondriyal apoptotik yolak bileşenlerini aktive etmektedir (Ulukaya ve ark. 2011; Gültekin ve ark. 2008; Li ve Yuan 2008).



Şekil. 1.7. Dış ve iç apoptotik yollar (Li ve Yuan 2008)

Apoptozun iç (mitokondriyal) yolağı; bu yolağın kontrolü ve düzenlenmesi Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bcl-2 ailesi, apoptozu baskılayan anti-apoptotik ve apoptozu indükleyen pro-apoptotik olmak üzere birbirine zıt etkili iki gruptan oluşmaktadır. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerin arasındaki denge, hücre için yaşam ya da ölüm seçimini sağlamaktadır. Bcl-2 ailesinin iyi bilinen anti-apoptotik üyeleri; Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 ve pro-apoptotik üyeleri; Bax, Bcl-xs, Bad, Bim, Bak, Bmf, Bok, Noxa ve Bid'i içermektedir (Atagün ve ark. 2011; Ulukaya ve ark. 2011). Pro-apoptotik üyeler hem sitozolik hem de mitokondriyal dış zarında bulunurken, Bcl-2 ve Bcl-XL'in mitokondriyal dış zarında bulunduğu bilinmektedir. Bcl-2 üyeleri, mitokondri zarındaki çeşitli porları düzenlemekte ve porlar açıldığında proapoptotik üyelerin salınımına yol açmaktadır (Zimmermann ve ark. 2001; Atagün ve ark. 2011).

Mitokondri, iç ve dış zarla çevrili olan ve iç-dış yoldan gelen sinyallerin birleştiği bir organeldir. Mitokondriye ait bu zarlar, hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Uyarıcı faktörler; mitokondri iç zarında porun açılması, mitokondri zar geçiş potansiyelinin kaybı ve proapoptotik proteinlerinin iki ana

grubunun iç zar alanından sitozole salınımı ile sonuçlanan değişikliklere neden olmaktadır.

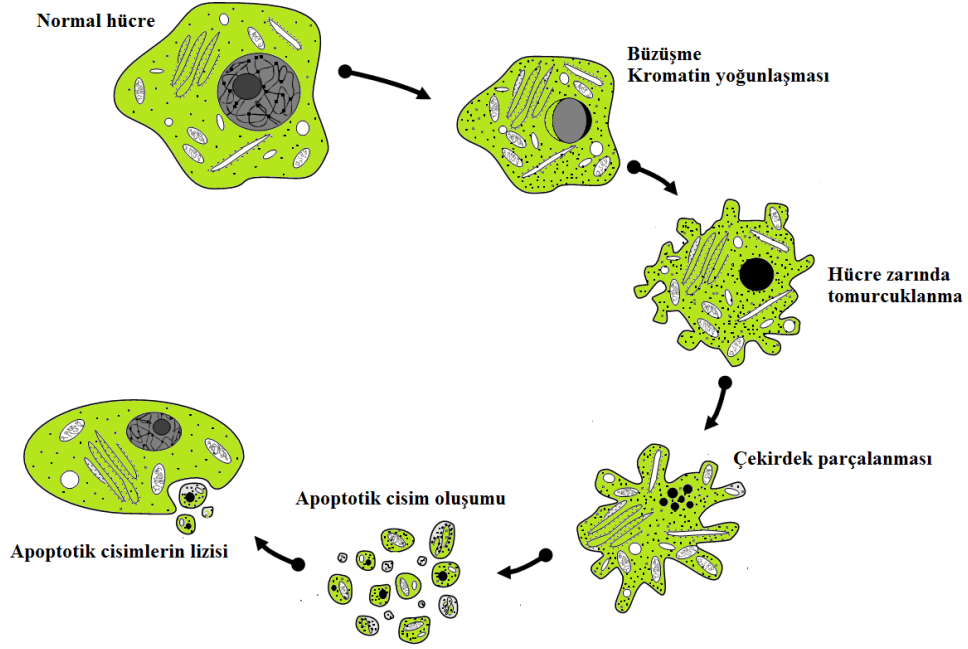
Birinci grup; sitokrom c, smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi'den oluşur. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive etmektedir. Sitokrom c, apoptotik şartlar altında mitokondriden ilk salınan protein olarak gösterilmektedir. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanmakta ve ATP'nin de katılmasıyla **apoptozom** adı verilen yapının oluşumu sağlanmaktadır. Prokaspaz-9 bağılı apoptozom, kaspaz 9'u aktifleştirmekte; kaspaz-9, kaspaz-3/7 gibi efektör kaspazları aktive ederek programlı hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlamaktadır. Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi, apoptoz proteinleri inhibitörleri (IAP) aktivitesini engelleyerek apoptozun düzenlenmesine katkıda bulunmaktadırlar (Lawen, 2003; Singh ve ark. 2010; Solakoğlu 2009; Elmore 2007; Saelens ve ark. 2004).

İkinci grup; pro-apoptotik proteinler olan apoptoz uyarıcı faktör (AIF), endonükleaz G ve kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD), mitokondriden apoptoz esnasında salınır, Ancak, bu işlem hücrenin ölüme hazırlanmasından sonra meydana gelen geç bir olaydır. AIF çekirdeğe transloke olmakta ve DNA'nın 50-300 kb'lık parçalara bölünmesine ve periferik çekirdek kromatininin yoğunlaşmasına neden olmaktadır. Endonükleaz G de çekirdeğe geçmekte ve çekirdek kromatinini keserek oligonükleozomal DNA fragmentlerini oluşturmaktadır. AIF ve endonükleaz G proteinlerinin her ikisinin de fonksiyonları kaspaz-bağımsız biçimdedir. CAD, kaspaz 3'ün kesilmesinden sonra çekirdeğe geçerek oligonükleozomal DNA fragmentasyonunu ve daha ileri bir kromatin yoğunlaşmasını sağlamaktadır (Elmore 2007; Eröz ve ark. 2012).

1.3.3. Apoptozda meydana gelen morfolojik değişiklikler

Işık ve elektron mikroskopisi ile apoptoz esnasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikler belirlenmiştir. Apoptozun erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, sitoplazma yoğunlaşır, organeller daha sıkı paketlenmiştir ve hücrede hacimce küçülme görülmektedir (Şekil 1.8). Kromatin

yoğunlaşması ise apoptozun en karakteristik özelliğidir (Elmore 2007; Öktem ve ark. 2001).



Şekil 1.8. Apoptozda meydana gelen morfolojik değişiklikler (Mastrangelo ve Betenbaugh 1998)

Apoptotik hücrelerde çift sarmal DNA'nın nükleozom birimlerine kesilmesiyle agaroz jel elektroforezinde 180-200 baz çifti büyüklüğündeki parçalar ip merdiven (ladder) görüntüsü oluşturmaktadır (Yıldırım ve ark. 2007; Ziegler ve Groscurth 2004). Apoptozun daha sonraki aşamalarında zarda tomurcuklanma, stoplazmik organellerin yapısal modifikasyonu ve zar bütünlüğünün kaybı gibi değişiklikler görülmektedir (Wong 2011). Hücre, yoğun olarak hücresel organeller ve nüklear fragmentler tarafından stoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanmaktadır. Bu hücreler makrofajlar, parankimal ve neoplastik hücreler tarafından fagosit edilmektedir. Apoptotik hücreler uzaklaştırılırken inflamatuvar bir reaksiyon oluşmamaktadır. Çünkü apoptotik hücrelerin bileşenleri çevre dokulara dağılmamakta, ikincil nekrozu engellemek amacıyla çabuk fagosit edilmekte ve fagosit edilen hücreler anti-inflamatuvar sitokinler oluşturmamaktadırlar. Eğer apoptotik hücre kalıntıları fagosit edilmezse ikincil nekroz olarak isimlendirilen

nekroza benzeyen bir yıkıma uğramaktadırlar (Öktem ve ark. 2001; Ziegler ve Groscurth 2004; Wong 2011; Elmore 2007).

1.4. Kaspaz-2 Aracılı Apoptoz Mekanizması

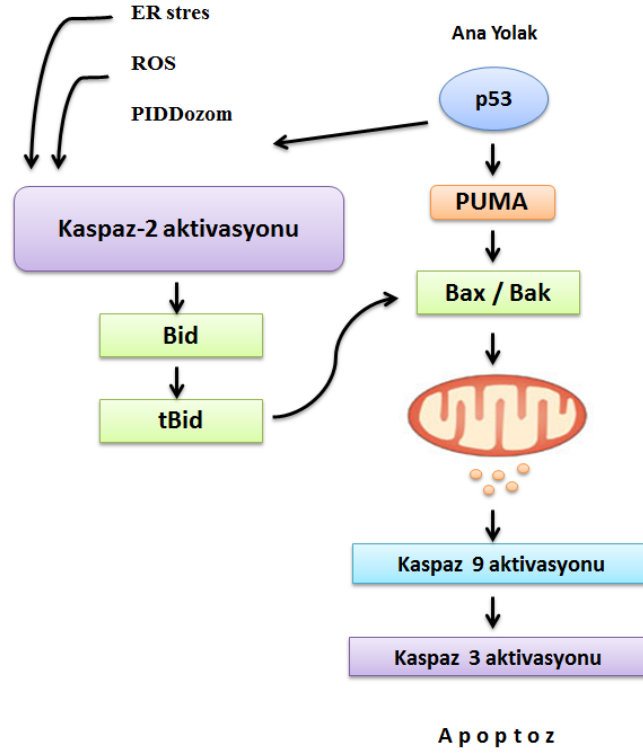
Kaspaz-2 ilk keşfedilen, evrimsel olarak korunmuş fakat biyolojik fonksiyonları ve etkilediği hedefler tam olarak bilinmeyen bir kaspazdır (Ho ve ark. 2009; Oliver ve ark. 2012). Kaspaz-2 nin apoptozdaki rolüyle ilgili zengin literatüre rağmen diğer başlatıcı kaspazlarla karşılaştırıldığında, bu proteinin apoptotik süreçteki göreviyle ilgili tartışmaların olması apoptotik kaskaddaki yerinin doğru bir şekilde anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. (Bouchier-Hayes ve ark. 2012; Vakifahmetoglu ve ark. 2006).

Kaspaz-2 başlatıcı kaspazlarla özellikle ced-3, kaspaz-1, 4, 5 ve 9 ile sekans benzerliği göstermektedir. Öncü-kaspaz-2 diğer başlatıcı kaspazlar gibi (51 kDa) uzun bir öncül-bölge içermektedir. Kaspaz-2 öncül-bölge yapısı kaspaz-9'a yakındır ve her ikisi de CARD bölgesi içermektedir. CARD, kaspaz 2 oligomeriasyonu/aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte kaspaz-2'nin kesilme özgünlüğü uygulayıcı (efektör) kaspazlar ile daha benzerdir. Bu yüzden kaspazlar arasında kaspaz-2 hem upstream (uzun öncül-bölge) hem de downstream (substrat özgünlüğü) özellikleri olan tek kaspazdır (Zhivotovsky ve Orrenius 2005). Öncü-kaspaz-2 yapısal olarak çekirdekte bulunan tek kaspazdır. Çekirdeğin yanında sitozolde, mitokondride ve golgi sisteminde de bulunmaktadır (Vakifahmetoglu ve ark. 2006).

Öncü-kaspaz-9'un apoptozom kompleksi tarafından aktive edildiği bilinmektedir. Öncü-kaspaz-2'nin de aktivasyonu için benzer bir oluşum gereklidir. Kaspaz-2 aktivasyonu ile **PIDDozom** adı verilen büyük bir protein kompleksinin oluşumu sonucunda gerçekleşebilmektedir. Bu kompleks PIDD (p53 indüklü ölüm bölgesi içeren protein), RAIDD ve kaspaz-2'den oluşmaktadır (Zhivotovsky 2005). PIDD, p53 uyarımlı ölüm bölgesi içeren proteindir, RAIDD ve öncü-kaspaz-2'ye bağlanmaktadır. PIDD dozunda artış, kaspaz-2 aktivasyonunu arttırır, düşük stres şartlarında PIDD dozu azalış göstermektedir.

PIDD seviyesinin azaltılması, p53 uyarımlı apoptozun da azalmasına neden olmaktadır (Baptiste-okoh 2008; Zhivotovsky 2005).

DNA hasarına ya da diğer hücresel stres sinyallere yanıt olarak p53 proteini bir BH3 proteini olan PUMA, bax, ya da bak proteinlerinin aktivasyonu yoluyla hücre ölümünü uyarmaktadır (Şekil 1.9). Bu proteinlerin aktivasyonu, mitokondriyal dış zar permeabilizasyonu (MOMP) ile başlayan ve kaspaz kaskadının aktivasyonuna kadar meydana gelen olayları tetiklemektedir. Alternatif bir yolak olarak kaspaz-2, MOMP'tan önce aktive edilmektedir. (Kumar 2009). Kaspaz-2 oligomerize olarak aktifleşmektedir.



Şekil 1.9. Kaspaz-2 aracılı ve kaspaz-2 bağımsız apoptotik yollar (Kumar 2009)

Kaspaz-2 uygulayıcı kaspazları doğrudan aktive etmek yerine MOMP'u (mitokondriyal dış zar permeabilizasyonu) indükleyerek dolaylı olarak aktive etmektedir. Kaspaz-2 proapoptotik Bcl-2 ailesi proteini olan Bid'in aktivasyonunu indüklemektedir. Bid ise sırasıyla mitokondriden sitokrom c salınımını indüklemektedir (Bouchier-Hayes 2010).

Sitokrom c salınımı sitoplazmada apaf-1 aktivasyonu ve apoptozom aracılı kaspaz-9 aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktif kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz kaskadını devam ettirmektedir. Böylece kaspaz-2'nin upstream mitokondriyal yolağı aktive ettiği görülmektedir (Bouchier-Hayes 2010; Kumar 2009)

Kaspaz-2'nin aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve endoplazmik retikulum stresinin indüklediği apoptoza da aracılık ettiği bilinmektedir. Kaspaz-2'nin kaybı ya da inhibe edilmesinin p53-aracılı apoptozu inhibe ettiği gösterilmektedir. Bununla birlikte kaspaz 2'nin yokluğunda birçok hücre tipi p53-bağımlı apoptoza da gidebilmektedir. Bu yüzden büyük ihtimalle kaspaz-2 yolağı bazı hücre tipleri için gereksizdir ya da diğer hücre tiplerinde yardımcı, yedek bir p53-bağımlı apoptoz olarak fonksiyon göstermektedir (Kumar 2009) .

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Kakao yağı, Otama; kayısı yağı, Defne & Doğa firmalarından temin edilmiştir. Kaspaz-2 aktivasyon test kiti, Promokine; WST-1 hücre çoğalma kiti, Clontech; FITC işaretli keçi anti fare p53 antikoru ve p53 fare monoklonal antikoru, Santa Cruz; RNase A, Invitrogen firmasından elde edilmiştir. Minimum Essential Medium (MEM), Biochrom AG; IMDM (Iscoe's modified Dulbecco's Medium); MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5difenil tetrazolyum bromid), PI (propidyum iyodid), sodyum sitrat, sodyum pürivat, sığır serum albümin (BSA), ethidyum bromid, akridin oranj, teknik DMSO (dimetil sülfoksit), PBS tablet, Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Teknik DMSO, EDTA, Paraformaldehit, Merck; Penisilin-streptomisin, Tripsin/EDTA ve FBS (Fetal Bovin Serum), PAA Laboratories GmbH; absolute etanol, Reidel de Haen firmasından satın alınmıştır. DAPI (4,6- diamino- 2- phenylindole) ve NaHCO₃ (sodyum bikarbonat), AppliChem; tripan mavisi solüsyonu, Thermo Scientific; TritonX-100, BDH prolabo firmasından sağlanmıştır.

2.2. Test maddelerinin hazırlanması

2.2.1. Yağ dozlarının hazırlanması

Ticari olarak temin edilmiş olan kakao ve kayısı yağları DMSO içerisinde çözülerek 57.1 µl/ml dilüsyonda ana stok hazırlanmıştır. Ardından, deneylerde kullanılacak dilüsyonlar, taze besiyeri ile seri dilüsyonlar yapılarak hazırlanmıştır. Malme-3M ve CRL-2120 hücrelerine maruz bırakılan kakao ve kayısı uçucu yağlarının uygulanan dilüsyonları Çizelge 2.1'de sunulmuştur. Yağ dilüsyonlarında kullanılan DMSO oranı % 0,1'in altındadır.

Çizelge 2.1. Malme-3M ve CRL-2120 hücrelerine maruz bırakılan kakao ve kayısı uçucu yağlarının uygulanan dilüsyonları. DMSO oranı % 0,1'in altındadır.

Kayısı Yağı (µl/ml)		Kakao Yağı (µl/ml)	
Malme-3M	CRL-2120	Malme-3M	CRL-2120
32	46	24.5	46
30.5	44.5	23	44.5
29	43	21.5	43
27.5	41.5	20	41.5
26	40	18	40
24,5	38.5	16.5	38.5
23	37	15	37
	35.5		35.5

2.3. YÖNTEM

2.3.1. Hücre kültürü

İnsan melanom hücreleri (Malme-3M); % 20 (v/v) FBS (fötal sığır serumu), 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, 1500 mg/L NaHCO₃, 100 ünite/ml penisilin streptomisin içeren modifiye edilmiş; Iscove's DMEM besiyeri içerisinde, insan sağlıklı deri fibroblast hücreleri (CRL-2120) ise % 10 FBS, Earle's Balanced Salt Solüsyon, 2 mM L-glutamine, 1500 mg/L NaHCO₃, non-esansiyal amino asit, 1 mM sodyum pirüvat, 100 ünite/ml penisilin içeren Minimum Essential Medium (MEM) besiyeri içerisinde 37 °C'de, %5CO₂ ve %95 hava bulunduran inkübatörde kültür edilmiştir.

Hücreler 25 cm² veya 75 cm²'lik flasklarda büyütülmüş, % 70 yoğunluğa ulaştıktan sonra; CRL-2120 hücresi % 1 ve Malme-3M hücresi % 5'lik tripsin/EDTA ile muamele edilerek pasajlanmıştır. Hücreler medyum içinde süspanse edilmiş, tripan mavisini ile 8 kuyulu tabakalar kullanılarak Cedex XS hücre sayım cihazında sayılmış ve ml'deki hücre sayısı, hücre kümelenmesi, hücre morfolojisi gibi büyüme verileri elde edilmiştir.

2.3.2. Sitotoksisite Deneyleri

2.3.2.1 MTT ve WST-1 reaktifleri ile mitokondriyal aktiviteye dayalı sitotoksik etki belirlenmesi

MTT yöntemi, canlı hücrelerde suda çözünür tetrazolyum tuzlarının mitokondriyal dehidrojenaz enzimi tarafından suda çözünmeyen koyu mavi/mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. MTT formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır ve kolorimetrik olarak ölçülmektedir (Stockert ve ark.2012; Vega-Avila ve Pugsley 2011). WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) testi ise mitokondriyal süksinat-tetrazolyum redüktazın formazan kristalleri oluşturması esasına dayanmasıyla MTT'ye benzer prensip göstermektedir. Ancak WST-1 yönteminde oluşturulan formazan kristalleri suda çözünmemektedir (Ngamwongsatit ve ark. 2008). MTT testi Mosmann'ın yöntemine göre (Mosmann 1983), WST-1 testi de kitin temin edildiği firmanın (Clontech) önerdiği yöntemine göre uygulanmıştır.

Her iki test için, Malme-3M ve CRL-2120 hücreleri $7,5 \times 10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve 24 saat kültür koşullarında inkübe edilmişlerdir. Ardından, hücrelerin besi yeri Çizelge 2.1'de belirtilen dilüsyonlarda kakao ve kayısı yağlarını içeren 100 µl taze besi yeriyle değiştirilmiş ve yeniden 24, 48 ve 72 saat inkübasyona devam edilmiştir. MTT testi için; inkübasyon süreleri sonunda her bir kuyuya 5mg/ml MTT final dilüsyonu olacak şekilde 125 µl MTT solüsyonundan eklenmiştir. 3 saat inkübasyon süresinin ardından solüsyon uzaklaştırılmış, her bir kuyuya canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için 100µl DMSO eklenmiş ve 15 dakika boyunca çalkalayıcı tablada (GFL-3012) bekletilmiştir. Formazan kristallerinin oluşturduğu renk şiddeti 570 nm dalga boyunda, ELISA (ELx808-IU) cihazında ölçülmüştür. MTT deneyleri her bir dilüsyon için 4-8 kuyucuk olmak üzere en az 2 ayrı deney şeklinde gerçekleştirilmiştir. WST-1 testi için; 24, 48 ve 72 saatin sonunda, her kuyuya 10 µl WST-1 hücre çoğalma reaktifi eklenerek 4 saat daha karanlıkta inkübasyona bırakılan hücre plakaları çalkalayıcı

tablada (GFL-3012) 1dk çalkalandıktan sonra, oluşan formazan kristalleri 490 nm dalga boyunda ELISA (ELx808-IU) cihazında okunmuştur.

2.3.2.2 Nötral kırmızısı (NR) alım testi ile lizozomal aktivite belirlenmesi

Yöntemin temeli, canlı hücrelerin ölü hücreler ile nötral kırmızısı (3-amino-m-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride) boyasını hücre içine almalarındaki farklılığa dayanmaktadır. Boya hücre zarını non-iyonik difüzyonla geçmekte ve lizozomal matrikse bağlanarak birirmektedir. Lizozomal zar bütünlüğü hücre canlılığı ile doğru orantı göstermektedir. Dolayısıyla lizozomal zarda meydana gelen değişiklikler boyanın bağlanma ve birikiminde azalmalara neden olmaktadır (Benassi ve ark. 2006; Dikmen ve ark. 2008; Pauloin ve ark. 2009; Ríos ve ark. 2003; Weyermann ve ark. 2005).

Nötral kırmızısı deneylerinde NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) tarafından hazırlanan protokol uygulanmıştır. Bu yöntemde, Malme-3M ve CRL-2120 hücreleri $7,5 \times 10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve 24 saat kültür koşullarında inkübe edilmişlerdir. Ardından, hücrelerin besi yeri Çizelge 2.1’de belirtilen dilüsyonlarda kakao ve kayısı yağlarını içeren 100 µl taze besi yeriyle değiştirilmiş ve yeniden 24, 48 ve 72 saat inkübasyona devam edilmiştir. Sürenin sonunda, kuyulardaki medyum uzaklaştırılmış, her bir kuyu DPBS-A ile yıkanmış ve taze hazırlanmış % 1 nötral kırmızısı içeren karışımından 250 µl eklenerek 3 saat süreyle hücreler inkübasyona bırakılmışlardır. 3 saat sonunda, plaka DPBS-A ile tekrar yıkanmış ve her bir kuyuya canlı hücreler tarafından oluşturulan NR kristallerinin çözülebilmesi için 100 µl DESORB (% 1 glasiyal asetik asit, % 49 etanol) eklenerek 15 dakika bekletilmiştir. Kuyularda oluşan renk şiddeti, ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. NR deneyleri her bir dilüsyon için 4-8 kuyu olmak üzere en az 2 ayrı deney şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.3.3. Apoptotik etkininin belirlenmesi

2.3.3.1 Akridin Oranj/Etidyum Bromid (AO/EB) çift boyama

Apoptotik ve nekrotik hücreler, akridin oranj ve etidyum bromid (AO/EB) çift boyama yapılarak incelenmiştir. Akridin oranj; plazma zarından geçerek hem canlı hem de ölü hücreleri boyayan ve çift zincir DNA ile etkileştiğinde yeşil floresan yayan bir boyadır. Etidyum bromid ise canlı ve erken apoptotik hücreler tarafından hücreye alınmayan, zar bütünlüğünü kaybetmiş hücrelerin içine girebilen ve çift iplikli DNA'yı kırmızı renkte boyayan bir boyadır (Ghelli ve ark. 2003; Raju ve ark. 2004; Attari ve ark. 2009).

AO/EB boyama için Ariffin ve arkadaşlarının (2009) kullandığı yöntem uyarlanarak uygulanmıştır. Malme-3M hücreleri 6 kuyulu kültür plakasına $2,2 \times 10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş, 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra çözücü kontrol için 1 μ l/ml DMSO, kakao yağının 21.5, 20 ve 18 μ l/ml dilüsyonları, kayısı yağının 26, 24.5 ve 23 μ l/ml dilüsyonları ile muamele edilmiş ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda her bir kuyu 1 ml besi yeri içerisinde toplanarak 150 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş, pellet üzerine 25 μ l besi yeri ilave edilmiştir. Boyama için, 100 mg/ml akridin oranj ve 100 mg/ml etidyum bromid ile 1:1 oranında karıştırılarak ana stok hazırlanmıştır. Ana stok boya 1:9 oranında besi yeri ile seyreltilerek bir ara stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ara stok'dan süspanse hücreler üzerine 1 μ l ilave edilerek preperat haline getirilmiştir. Her bir preperat 10 dk boyunca floresan mikroskopta (Olympos BX50), WB filtrede incelenerek fotoğraflanmıştır. Çekilen fotoğraflardan her bir dilüsyon için 500-1500 hücre sayılarak apoptotik hücre oranı belirlenmiştir.

2.3.3.2 Hücre döngüsü analizi

Kakao ve kayısı yağlarının Malme-3M hücrelerinde G₁, S ve G₂ hücre döngüsü evrelerinin dağılımına etkisini araştırmak amacıyla hücrelerin DNA içeriği akım sitometride analiz edilmiştir. Çalışmada Kang ve arkadaşları (2009), Li ve arkadaşları (2009) ile Yoshida ve arkadaşlarının (2007) yöntemleri geliştirilerek kullanılmıştır. Malme-3M hücreleri, 6 kuyulu kültür plakasına 2.2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş, 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelere serum içermeyen besi yeri ile 24 saat boyunca muamele edilerek, bütün hücrelerin G₀/G₁ evresinde eşitlenmesi amacıyla senkronize edilmiştir. 24 saat sonra, hücrelere 1 µl/ml DMSO, kakao yağının 20 ve 18 µl/ml dilüsyonları, kayısı yağının 26 ve 24.5 µl/ml dilüsyonlarıyla 24 ve 48 saat sürelerde muamele edilmiştir. Ardından, her bir kuyudaki hücre süspansiyonu 150 xg de 5dk santrifüj edilmiş ve 125 µl 1X PBS ile yıkanmıştır. Hücre pelleti üzerine % 70 etanol solüsyonu eklenmiş, 4°C'de 30 dk bekletilerek hücrelerin tespit edilmesi sağlanmıştır. 150 xg de 5dk tekrar santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılmış ve pellet 1X PBS ile yıkanmış ve 20 µg /ml RNAaz enzimi içeren 125 µl % 1.12 (w/v) sodyum sitrat solüsyonu ile 37 °C'de 30 dk boyunca muamele edilmiştir. Santrifüj edilen hücreler 50 µg /ml propidyum iyodid içeren 125 µl % 1.12 (w/v) sodyum sitrat solüsyonu ile 37 °C'de 30 dk boyunca muamele edilmiştir. Süre sonunda, örnekler akım sitometri tüplerine aktararak analize kadar buz içerisinde bekletilmiştir. Analiz akım sitometri cihazında (BD FACS Aria) en az 1×10^4 hücre akışı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen DNA içeriği histogram grafiği ModFit LT programında değerlendirilerek çözücü kontrol ve her bir uçucu yağ dilüsyonu için hücre döngüsü evrelerinin dağılım yüzdeleri hesaplanmıştır.

2.3.3.3 p53 proteininin immünofloresan boyama yöntemiyle tespiti

Kakao ve kayısı yağlarının belirlenen dozlarıyla muamele edilen Malme-3M hücrelerinde, hücre içi p53 protein seviyesinin ve yerleşiminin tespiti için immünofloresan boyama, hücre çekirdeklerinin belirlenmesi için ise DAPI boyama yapılmıştır. Çalışmada, Yih ve Lee (2000) ile Ferbeyre ve arkadaşlarının (2002) yöntemleri geliştirilerek uygulanmıştır. Hücreler $2,3 \times 10^4/\text{cm}^2$ olacak şekilde lamellere ekilmiş, 24 saat inkübasyonun sonunda, 21.5, 20 ve 18 $\mu\text{l}/\text{ml}$ kakao ve 26, 24.5 ve 23 $\mu\text{l}/\text{ml}$ kayısı yağları ve çözücü kontrolü olarak da % 0,1 DMSO içeren taze besi yeri verilerek 12 ve 24 saat daha kültür ortamında büyütülmüşlerdir. Uçucu yağlar ile maruziyet sonrasında besi yeri uzaklaştırılmış, lameller 1X PBS ile 2 kez 1dk yıkanmıştır. % 4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında 45 dk tespit edildikten sonra, tespit solüsyonu 3 kez 1X PBS ile çalkalamalı ortamda yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Ardından, özgül olmayan antikor bağlanmasını engellemek amacıyla, % 1 BSA (Sığır Serum Albumin) ile 37°C 'de 30 dk boyunca zemin bloklanmıştır. 1X PBS ile 5 dk'lık 3 yıkama işleminin ardından, 1:100 oranında % 1 BSA ile seyreltilmiş p53 insan monoklonal antikor (Primer antikor; Santa Cruz) ile 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir. % 1 Triton X-100/1X PBS solüsyonu ile 5 dk'lık 3 yıkama yapılarak fazla antikor uzaklaştırılmış ve 1:200 oranında % 1 BSA ile seyreltilmiş FITC işaretli keçi anti human antikor (ikincil antikor; Santa Cruz) 37°C 'de karanlık ortamda 1 saat uygulanmıştır. Daha sonraki işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. İkinci antikor uzaklaştırmak için de % 1Triton X-100/1X PBS ile 5 dk'lık 3 yıkama yapılmıştır. Gliserol, 1X PBS ve DAPI ile hazırlanmış kaplama solüsyonu her bir lamel için 20 μl olmak üzere lama damlatılmış, üzerine lameller kapatılarak tırnak cilası ile sabitlenmiş ve preperat haline getirilmiştir. Her bir preperatta aynı alan Olympos BX50 mikroskopta, DAPI boyası için NU filtre, FITC işaretli antikor için WB filtre kullanılarak, 400X büyütmede fotoğraflanmıştır.

2.3.2.4 Kaspaz-2 aktivasyonunun belirlenmesi

Mame-3M hücrelerinde kaspaz-2 enzim seviyesi Promokine Green Kaspaz-2 boyama kiti kullanılarak belirlenmiştir. Bir kaspaz-2 inhibitörü olan FITC işaretli VDVAD-FMK, hücre içerisinde kaspaz-2'ye bağlanmakta ve aktif halde bulunan enzim seviyesinin akım sitometride belirlenmesini sağlamaktadır.

Çalışma, üretici firmanın önerdiği protokole göre yürütülmüştür. Bu amaçla; Malme-3M hücreleri 12'li plakalara 8×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 1 μ l/ml DMSO; 21.5 ve 20 μ l/ml kakao yağı, 26, 24.5 ve 23 μ l/ml kayısı yağları ile 12, 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir örnek ayrı bir tüpte toplanmış ve 150 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet halindeki hücrelere 300 μ l besi yeri ilave edilmiştir. Her bir tüpe 1 μ l FITC işaretli kaspaz-2 inhibitörü olan VDVAD-FMK ilave edilmiş; 37°C'de , % 5 CO₂ içeren karanlık ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, pellet üzerine 500 μ l yıkama solüsyonu ilave edilerek yeniden yıkanmıştır. Örnekler akım sitometride analize kadar 300 μ l yıkama solüsyonu içerisinde ve buz üzerinde bekletilmiştir. Analiz akım sitometri cihazında (BD FACSAria) en az 1×10^4 hücre akışı FITC lazer ayarları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.3.4. Sağlıklı deri hücrelerinde (CRL-2120) UV-B'nin sitotoksik etkisinin belirlenmesi

2.3.4.1 UV-B ışığında IC50 değerinin belirlenmesi

Bu çalışmada; CRL-2120 hücrelerinin UV-B ışınlarına karşı duyarlılığının tespit edilmesi ve uçucu yağlar ile kombine uygulanacak UV-B için IC₅₀ değerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. CRL-2120 hücreleri, hücre kültürüne uygun her bir petriye 2×10^5 hücre ekilmiştir. Petrilere bir tanesi UV-B ışınlarına maruz bırakılmayacak kontrol grubunu oluşturmuştur. 24 saat sonra petrilere UV-B ışınlarına maruz bırakılmıştır.

Petrilere UV-B uygulaması için; UVP marka chromato-vue C-65 model kabin içerisine yerleştirilmiş UVP marka EL-serisi, üç farklı dalga boyu seçeneğine sahip (254, 302, 365 nm) 8 watt gücünde lamba kullanılmıştır. Ji ve arkadaşlarının insan keratinosit ve sağlıklı deri fibroblast hücreleri ile yaptığı bir çalışmada 15 ve 20 mJ/cm² dozlarının canlılığı inhibe edici etki gösterdiği belirlenmiştir (Ji ve ark. 2012). Çalışmamızda ise ön araştırma olarak CRL-2120 hücrelerine 15 ve 30 mJ/cm² UV-B dozları uygulanmış ancak canlılığı inhibe edici etki gözlenmemiştir. Daha sonraki çalışmalarda geniş aralıklarla 900 mJ/cm² dozuna kadar UV-B uygulanmış, son olarak 550 mJ/cm², 600 mJ/cm², 650 mJ/cm², 700 mJ/cm², 750 mJ/cm² ve 800 mJ/cm² UV-B doz aralığı denenmek üzere seçilmiştir. Petrilere UV-B uygulamasından 1 saat önce cihazın lambası çalıştırılarak ısınması sağlanmıştır. Süre sonunda cihazın sağladığı UV-B ışın yoğunluğu UVP marka sensör ile 1.75 mW/cm² olarak ölçülmüştür.

UV-B enerji yoğunluğu birimi ya da UV-B dozları (mJ/cm²), enerji şiddetinin (mW/cm²) uygulama süresi (sn) ile çarpılmasıyla hesaplanmaktadır.

$$\text{UVB dozu [mJ/cm}^2\text{]} = \text{UVB ışın yoğunluğu [mW/cm}^2\text{]} \times \text{Temas süresi [saniye]}$$

Yukarıda belirtilen formül ile hücrelerin belirlenen UV-B dozlarına maruz kalması gereken süre hesaplanmıştır. Bu durumda her bir UV-B dozu için petrilere 550 mJ/cm²-314 saniye, 600 mJ/cm²-343 saniye, 650 mJ/cm²-372 saniye, 700 mJ/cm²-401 saniye, 750 mJ/cm²-420 saniye ve 800 mJ/cm²-571 saniye UV-B ışınlarına maruz bırakılmıştır. UV-B maruziyeti esnasında hücreler 1X PBS içerisinde bulunmakta, UV-B ışınlarına maruz bırakılmayan kontrol petrisi ise UV-B ışınlarına en uzun süre maruz kalan hücreler ile eşit sürede, steril kabinde 1X PBS içerisinde bekletilmiştir. UV-B maruziyeti sonrasında her bir petriden 1X PBS uzaklaştırılıp taze besi yeri ilave edilerek hücreler inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyonun ardından, her bir UV-B dozu ve kontrol grubundaki hücreler, besi yeri içerisinde süspanse edilerek Cedex XS hücre sayım cihazında tripan mavisi ile 8 kuyulu slaytlar kullanılarak sayılmıştır. Sayım sonucunda,

CRL-2120 hücrelerinin maruz kaldığı her bir UV-B dozu için hücre sayısı/ml ve hücre canlılığı yüzde değerler olarak belirlenmiştir.

2.3.4.2 Kayısı ve kakao yağlarının sağlıklı deri hücrelerinin UV-B hassasiyeti üzerine etkilerinin belirlenmesi

CRL-2120 hücrelerinde kakao ve kayısı yağlarının UV-B ışınları ile kombine etkisinin belirlenmesi amacıyla; uygulanacak UV-B dozları, UV-B sitotoksik etki testinin sonucuna dayalı olarak, 550 mJ/cm², 650 mJ/cm² ve 750 mJ/cm² olarak belirlenmiştir. UV-B dozlarıyla birlikte kombine olarak uygulanan uçucu yağların dilüsyonları ise kayısı için 35.5, 37 ve 38.5 µl/ml, kakao yağı için 34, 35.5 ve 37 µl/ml olarak seçilmiştir. CRL-2120 hücreleri 96 kuyulu 8 adet hücre kültürü plakasına kuyu başına 7,5x10³ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Her bir plaka; uçucu yağ eklenmemiş negatif kontrol, çözücü kontrol (DMSO) ve uçucu yağın üç dilüsyonunun test edildiği deney gruplarını içermektedir. Plakalara tasarlanan deney planı Çizelge.2.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Kakao ve kayısı yağlarının UV-B hassasiyeti üzerine etkilerinin belirlenmesi için tasarlanan deney plakaları (Knt:kontrol, 1 µl/ml DMSO dilüsyonu, Kk: kakao yağı, Ky: kayısı yağını ifade etmektedir)

1. plk UVB (-)	Knt(yağ-)	Dmso	Kk (34 µl/ml)	Kk(35,5 µl/ml)	Kk (37 µl/ml)
2. plk UVB (-)	Knt (yağ-)	Dmso	Ky(35,5 µl/ml)	Ky(37 µl/ml)	Ky(38,5 µl/ml)
3. plk 550mJ/cm ²	Knt (yağ-)	Dmso	Kk(34 µl/ml)	Kk(35,5 µl/ml)	Ky(37 µl/ml)
4. plk 550mJ/cm ²	Knt (yağ-)	Dmso	Ky(35,5 µl/ml)	Ky (37 µl/ml)	Ky(38,5 µl/ml)
5. plk 650mJ/cm ²	Knt (yağ-)	Dmso	Kk (34 µl/ml)	Kk(35,5 µl/ml)	Kk(37 µl/ml)
6. plk 650mJ/cm ²	Knt (yağ-)	Dmso	Ky(35,5 µl/ml)	Ky(37 µl/ml)	Ky(38,5 µl/ml)
7. plk 750mJ/cm ²	Knt (yağ-)	Dmso	Kk (34 µl/ml)	Kk(35,5 µl/ml)	Kk(37 µl/ml)
8. plk 750mJ/cm ²	Knt (yağ-)	Dmso	Ky(35,5 µl/ml)	Ky(37 µl/ml)	Ky(38,5 µl/ml)

Hücrelerin plakaya ekiminden 24 saat sonra, her bir kuyudaki besi yeri, 34, 35.5 ve 37 µl/ml kakao yağı ile 35.5, 37 ve 38,5 µl/ml kayısı yağı içeren taze besi yerleriyle değiştirilmiştir. Çözücü kontrolünün test edildiği kuyulara ise 1 µl/ml DMSO içeren besi yeri ilave edilmiştir. İkinci bir 24 saat inkübasyonun sonunda, plakalar 1X PBS ile yıkanmış ve her bir kuyuya 100 µl 1X PBS eklenmiştir.

Plakalara UV-B uygulaması için; UV-B dozları, 550 mj/cm², 650 mj/cm² ve 750 mj/cm² olarak belirlenmiştir. Cihazın lambasının ısınması sağlandıktan sonra, 302 nm’de cihazın sağladığı UV-B ışın yoğunluğu sensör ile 2.03 mW/cm² olarak ölçülmüştür. Enerji formülü ile istenilen UV-B dozlarında hücrelerin maruz kalması gereken süre hesaplanmıştır. Bu durumda, her bir UV-B dilüsyonu için bağımsız bir plaka olacak şekilde, hücreler 550 mj/cm²-242 saniye, 650 mj/cm²-286 saniye ve 750 mj/cm²-330 saniye UV-B’ye maruz bırakılmıştır. Son plakaya ise UV-B uygulanmamıştır. Diğer plakalara UV-B uygulaması yapıldığı sırada (48. saatte), bu plakadaki hücreler 1X PBS içinde bekletilmiş ve diğerleri gibi belirtilen oranlarda uçucu yağları ve DMSO içeren besi yeri eklenerek 24 saatlik inkübasyona maruz bırakılmıştır. Ardından, her bir kuyuya 10 µl WST-1 eklenerek 4 saat daha inkübasyonun ardından plaka çalkalayıcı tabla da 1 dk bekletilmiştir. Oluşan renk şiddeti 490 nm dalga boyunda, ELISA plaka okuyucu cihazda ölçülmüştür.

2.3.5. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 18 for Windows (Statistical Programme for Social Sciences) paket programı kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. MTT, WST-1 ve NR alınımı, AO/EB boyama ve tripan mavisi boyama yöntemlerinde elde edilen değerler; general linear model/Univariate (ANOVA) analizi ile değerlendirilmiş ve çoklu karşılaştırma için Bonferroni, Scheffe, Tukey ve Tamhane’s T2 izleme (post-hoc) testleri uygulanmıştır. Veri analizlerinde varyans eşleşliği şartı Levene testi ile ölçülmüş, bulunan anlamlılık değeri (p)>0.001 ise Scheffe, p<0,001 ise Tamhane’s T2 testleri yorumlanmıştır. Tüm istatistiksel analizlerde p<0.001 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Kakao Yağının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

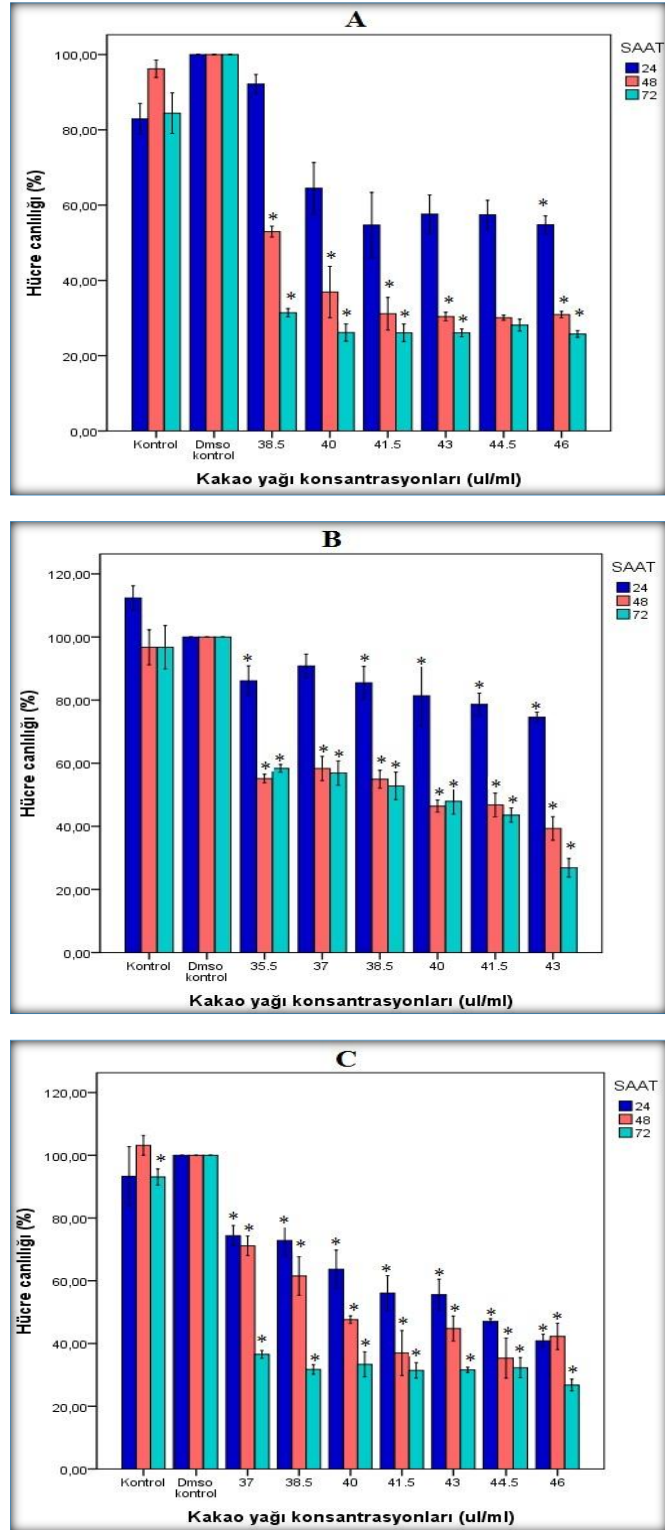
3.1.1. CRL-2120 hücreleri

Kakao yağının CRL-2120 (sağlıklı deri fibroblast) hücrelerin canlılığı üzerine etkisi; WST-1, MTT ve NR alınımlı yöntemleri uygulanarak belirlenmiştir. Materyal ve yöntemde belirtildiği gibi, kakao yağının çeşitli dilüsyonlarıyla muamele edilen CRL-2120 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonra tespit edilen canlılık oranları Şekil 3.1A, B ve C’de verilmiştir.

Kakao yağının WST-1 yöntemi ile CRL-2120 hücrelerinde tespit edilen sitotoksik etkisi incelendiğinde; 24 saat inkübasyon sonunda, 38.5 µl/ml dilüsyonunun çözücü kontrol (1 µl/ml DMSO)’e yakın canlılık gösterdiği, uygulanan diğer dilüsyonlarında ise canlılığın % 50-65 arasında olduğu belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.1A’da sunulmuştur. WST-1 yönteminde, CRL-2120 hücrelerinde kakao yağının 24 saatte en düşük dilüsyonu 38.5 µl/ml’de canlılık % 90’ın üzerinde gözlenirken, en yüksek dilüsyon 46 µl/ml’de hücre canlılığı % 55 olarak tespit edilmiştir. CRL-2120 hücrelerinde WST-1 boyama sonucunda kakao yağının 48 saatin sonunda, IC₅₀ değeri yaklaşık olarak 38.5-40 µl/ml) arasında belirlenmiş, daha yüksek dilüsyonlarda ise hücre canlılığının yaklaşık % 30-35 oranında olduğu gözlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonunda ise IC₅₀ değeri tespit edilememiş, uygulanan bütün dilüsyonlarda canlılık % 40’ın altında tespit edilmiştir.

MTT yöntemi ile elde edilen sitotoksik etkileri incelendiğinde; 24 saat sonunda 35.5-43 µl/ml arasındaki dilüsyonlarda, % 75 ile 90 arasında hücre canlılığı gözlenmektedir (Şekil 3.1B). 48 ve 72 saat inkübasyonda MTT yöntemine göre IC₅₀ değeri yaklaşık olarak 40 µl/ml olarak belirlenmiştir. NR alınımlı yönteminden elde edilen sonuçlara bakıldığında; kakao yağının çeşitli dilüsyonları uygulanan CRL-2120 hücrelerinde 24 saatin sonunda, dilüsyona bağlı olarak canlılık azalmaktadır (Şekil 3.1C). IC₅₀ değeri 24 saatte yaklaşık 44.5 µl/ml, 48

saatte ise 40µl/ml olarak belirlenmiştir. NR alınımlı yönteminde 72 saatte % 50'den daha az hücre canlılığı gözlenmiştir.



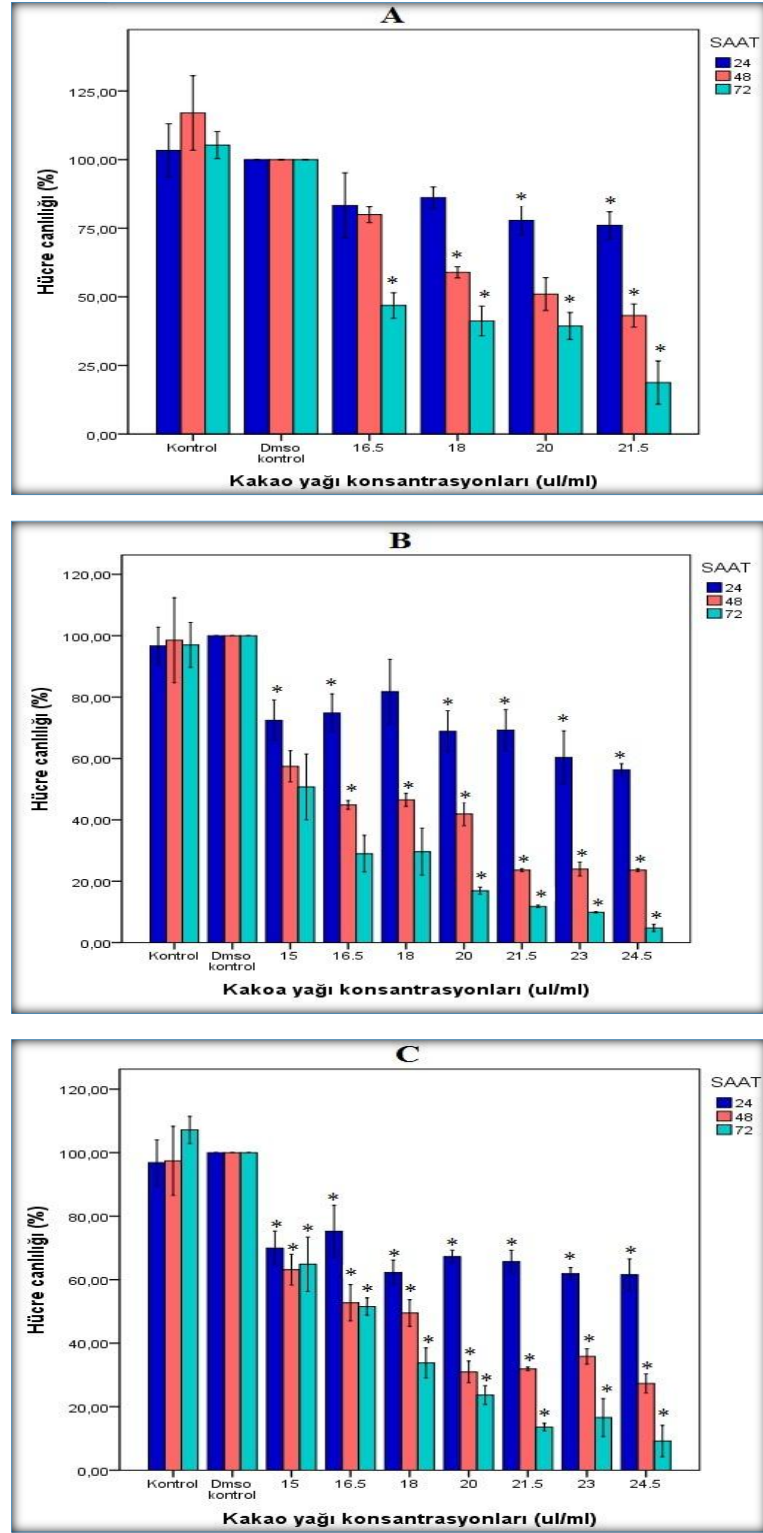
Şekil 3.1. Kakao yağının CRL-2120 hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 (A), MTT (B) ve NR alınımlı (C) ile değerlendirilmesi. (*:DMSO kontrole göre anlamlı fark, p<0,001)

WST-1 ve MTT ve NR alınımı yöntemlerinde, kakao yağı ya da DMSO muamelesi yapılmayan kontrol grubu ise 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde DMSO kontrol grubuna (1 µl/ml) yakın canlılık değerleri göstermektedir.

3.1.2. Malme-3M hücreleri

Kakao yağının Malme-3M (insan deri kanseri) hücrelerinde canlılık üzerine etkisi WST-1, MTT ve NR yöntemleriyle araştırılmıştır. Çözücü kontrol olarak DMSO (1 µl/ml) ve kakao yağının belirli dilüsyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerde canlılık oranları Şekil 3.2A, B ve C’de belirtilmiştir.

WST-1 yöntemine göre; Malme-3M hücrelerinin 16.5-21.5 µl/ml arasındaki çeşitli dilüsyonlarda kakao yağıyla muamelesinden 24 saat sonra canlılık oranlarının % 75-85 arasında olduğu gözlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.2A’da sunulmuştur. 48 saat sonunda ise hücre canlılığında dilüsyona bağlı bir azalma gözlenmiştir. 48 saat için IC₅₀ değeri 20 µl/ml iken, 72 saatte IC₅₀ değeri yaklaşık 16.5 µl/ml bulunmuştur. Kakao yağının Malme-3M hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile de incelemiştir (Şekil 3.2B). 24 saatlik inkübasyonun sonunda, uygulanan bütün dilüsyonlarda hücre canlılığı % 55-80 olarak gözlenirken, 48 saat için 18 µl/ml, 72 saat için ise 15 µl/ml dilüsyonları IC₅₀ değeri olarak belirlenmiştir. NR alınımı yöntemine göre; Malme-3M hücrelerinde belirlenen hücre canlılığı Şekil 3.2C’de gösterilmiştir. 24 saat inkübasyonda hücre canlılığının % 60-75 arasında olduğu gözlenmiştir. 48 saat inkübasyonda DMSO kontrole kıyasla hücre canlılığının en düşük dilüsyonda % 35, en yüksek dilüsyonda ise 75 oranında azaldığı gözlenmiş, 48 saat için IC₅₀ değeri 18 µl/ml olarak belirlenmiştir. 72 saat inkübasyonda ise canlılık dilüsyona bağlı olarak düşüş göstermiştir. 72 saat inkübasyonda ise IC₅₀ değeri 16.5 µl/ml olarak bulunmuştur. Malme-3M hücrelerinde uygulanan WST-1, MTT ve NR alınımı yöntemlerinde kontrol grubu 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde DMSO kontrol grubuna yakın canlılık değerleri gösterdiği belirlenmiştir.



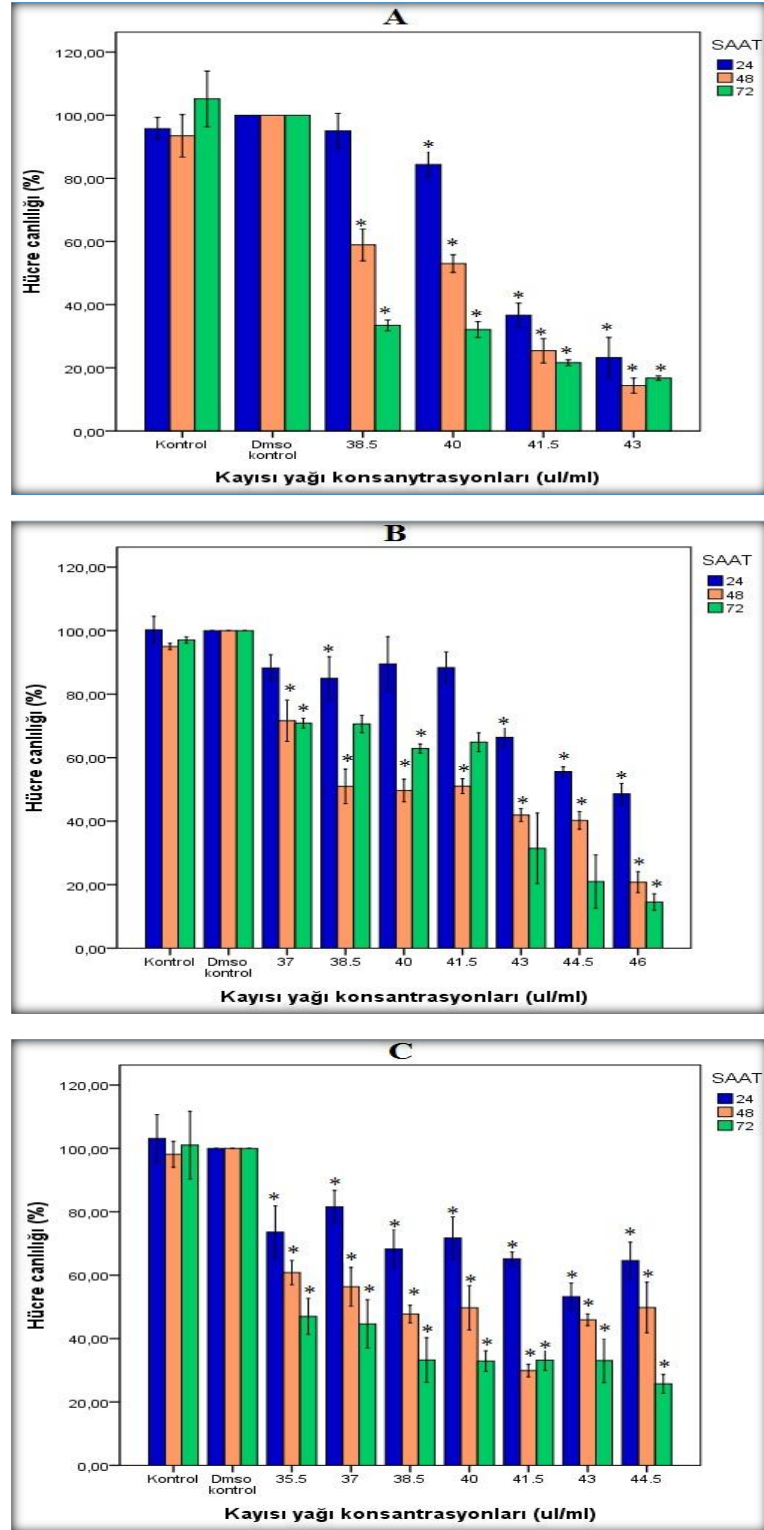
Şekil 3.2. Kakao yağının Malme-3M hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 (A), MTT (B) ve NR alınımlı (C) ile değerlendirilmesi (*:DMSO kontrole göre anlamlı fark, $p<0,001$)

3.2. Kayısı Yağının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

3.2.1. CRL-2120 hücreleri

Kayısı yağının CRL-2120 hücreleri canlılığı üzerine etkisi WST-1, MTT ve NR alınımlı yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Kayısı yağı dilüsyonları ile muamele edilen CRL-2120 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda tespit edilen canlılık oranları Şekil 3.3A, B ve C’de verilmiştir.

Kayısı yağının CRL-2120 hücreleri üzerinde WST-1 yöntemi ile tespit edilen canlılık oranları incelendiğinde; 24, 48 ve 72 saat inkübasyonda dilüsyona bağlı olarak canlılığın azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.3A). 24 saatin sonunda, 38.5 ve 40 µl/ml kayısı dilüsyonlarında hücre canlılığının DMSO kontrol’e yakın değerlerde olduğu, 41.5 ve 43 µl/ml dilüsyonlarında ise % 40’ın altında olduğu dikkati çekmektedir. 48 saat sonundaki hücre canlılığı dilüsyona bağlı olarak azalırken IC₅₀ değeri 40 µl/ml olarak belirlenmiştir. 72 saat inkübasyonda ise uygulanan tüm kayısı yağı konsantrasyonlarında hücre canlılığının % 40’ın altında olduğu görülmüştür. MTT sonuçlarına göre ise 24 saat inkübasyonda hücre canlılığının 43 µl/ml dilüsyonundan itibaren azaldığı tespit edilirken, IC₅₀ değerinin en yüksek dilüsyon olan 46 µl/ml olduğu görülmüştür (Şekil 3.3B). 48 saatin sonunda 38.5, 40 ve 41.5 µl/ml kayısı yağı dilüsyonlarında yaklaşık % 50 canlılık değerleri gözlenmiş, IC₅₀ değeri olarak 38.5 µl/ml tespit edilmiştir. 72 saat inkübasyonda ise 38.5, 40 ve 41.5 µl/ml dilüsyonlarında, hücre canlılığında 48 saate göre küçük bir artış gözlenirken, 43 µl/ml dilüsyonundan itibaren canlılık % 40’ın altına düşmektedir. Dolayısıyla, 72 saat için IC₅₀ değerinin 41.5-43 µl/ml arasında olduğu görülmektedir. Kayısı yağı ile muamele edilen CRL-2120 hücrelerinin NR alımı deney sonuçlarına göre IC₅₀ değerleri; 24 saat için yaklaşık 43 µl/ml (Şekil 3.3C), 48 saat için 40 µl/ml ve 72 saat için yaklaşık olarak 35.5 µl/ml olarak bulunmuştur.



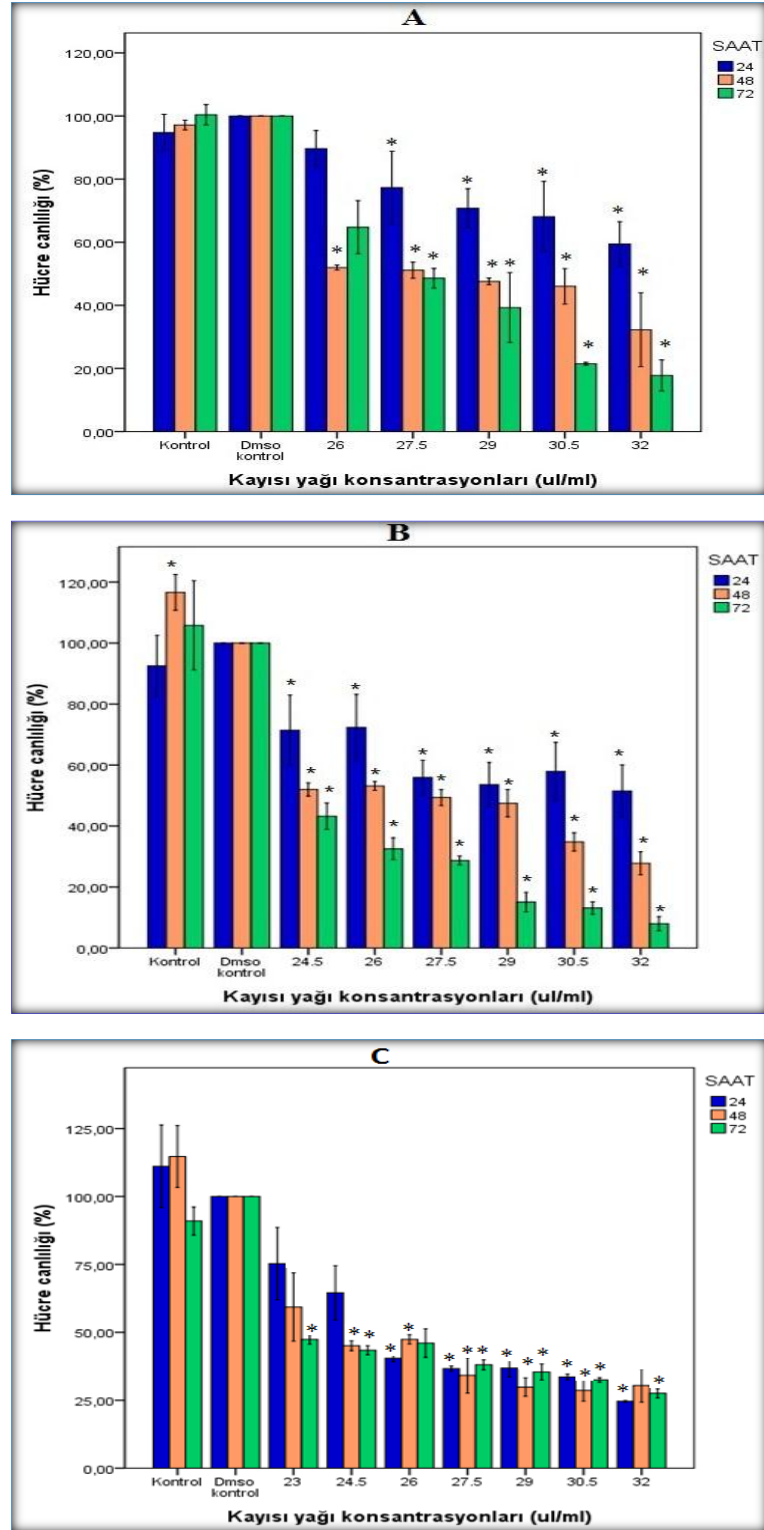
Şekil 3.3. Kayısı yağının CRL-2120 hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 (A), MTT (B) ve NR alınımlı (C) ile değerlendirilmesi. (* $p < 0,001$)

3.2.2. Malme-3M hücreleri

Kayısı yağının Malme-3M hücreleri canlılığı üzerine etkisi WST-1, MTT ve NR alınımı yöntemleri ile araştırılmıştır. Kayısı yağının farklı dilüsyonlarına 24, 48 ve 72 saat sürelerle maruz bırakılan hücrelerde tespit edilen canlılık oranları Şekil 3.4A, B ve C’de verilmiştir.

WST-1 yöntemine göre; Malme-3M hücrelerinin 24 saat inkübasyon süresinde kayısı yağı dilüsyonuna bağlı olarak canlılığın azaldığı, ancak en yüksek dilüsyonda (32 µl/ml) canlılığın yaklaşık % 60 olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.4A). 48 saat inkübasyonda ise 26 ve 27.5 µl/ml dilüsyonlarında canlı hücre oranı birbirine yakın ve % 50 olarak belirlendiğinden, 48 saat için IC₅₀ değeri 26 µl/ml kabul edilmiştir. 72 saatin sonunda, hücre canlılığı dilüsyona bağlı olarak azalış gösterirken, 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan hücrelerin sayısında 24 saate göre bir miktar artış gözlenmiştir. 72 saat için IC₅₀ değeri 27.5 µl/ml olduğu Şekil 3.4.A’da görülmektedir.

Malme-3M hücrelerinin kayısı yağının çeşitli dilüsyonları ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında elde edilen MTT testi sonuçları incelendiğinde; 24 saatin sonunda 26-32 µl/ml arasındaki bütün dilüsyonlarda canlı hücre sayısında doz artışına paralel bir azalma dikkati çekmiştir. Canlılık yaklaşık % 70-75’den %50’ lere gerilemiştir. Kayısı yağının en yüksek dilüsyonu olan 32 µl/ml’de canlılık 24 saatte yaklaşık % 51 ile 54 arasında belirlenmiştir (Şekil 3.4B). 48 saatte ise 26, 27.5 ve 29 µl/ml kayısı yağı dilüsyonlarında % 53-49 oranlarında canlılık gözlenmiş, 27.5 µl/ml dilüsyonu IC₅₀ değerine daha yakın olarak bulunmuştur. 72 saat inkübasyonda hücre canlılığı dilüsyondaki azalmaya paralel bir azalış göstermiştir, uygulanan yağ dilüsyonlarında % 50’nin altında hücre canlılığı görülmüştür. NR alınımı yöntemine göre; Malme-3M hücrelerinde belirlenen hücre canlılığı Şekil 3.4C’de gösterilmiştir. Her üç inkübasyon süresinde de, hücre canlılığı doza bağlı bir azalma göstermiştir. 24 saatin sonunda, IC₅₀ değeri 26-24.5 µl/ml arasında belirlenirken, 48 saat için IC₅₀ değeri 26 µl/ml, 72 saatte için ise 23 µl/ml olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.4. Kayısı yağının Malme-3M hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 (A), MTT (B) ve NR alınımlı (C) ile değerlendirilmesi (* p<0,001)

3.3. Malme-3M Hücrelerinde Apoptotik Morfoloji

3.3.1. Kakao yağı

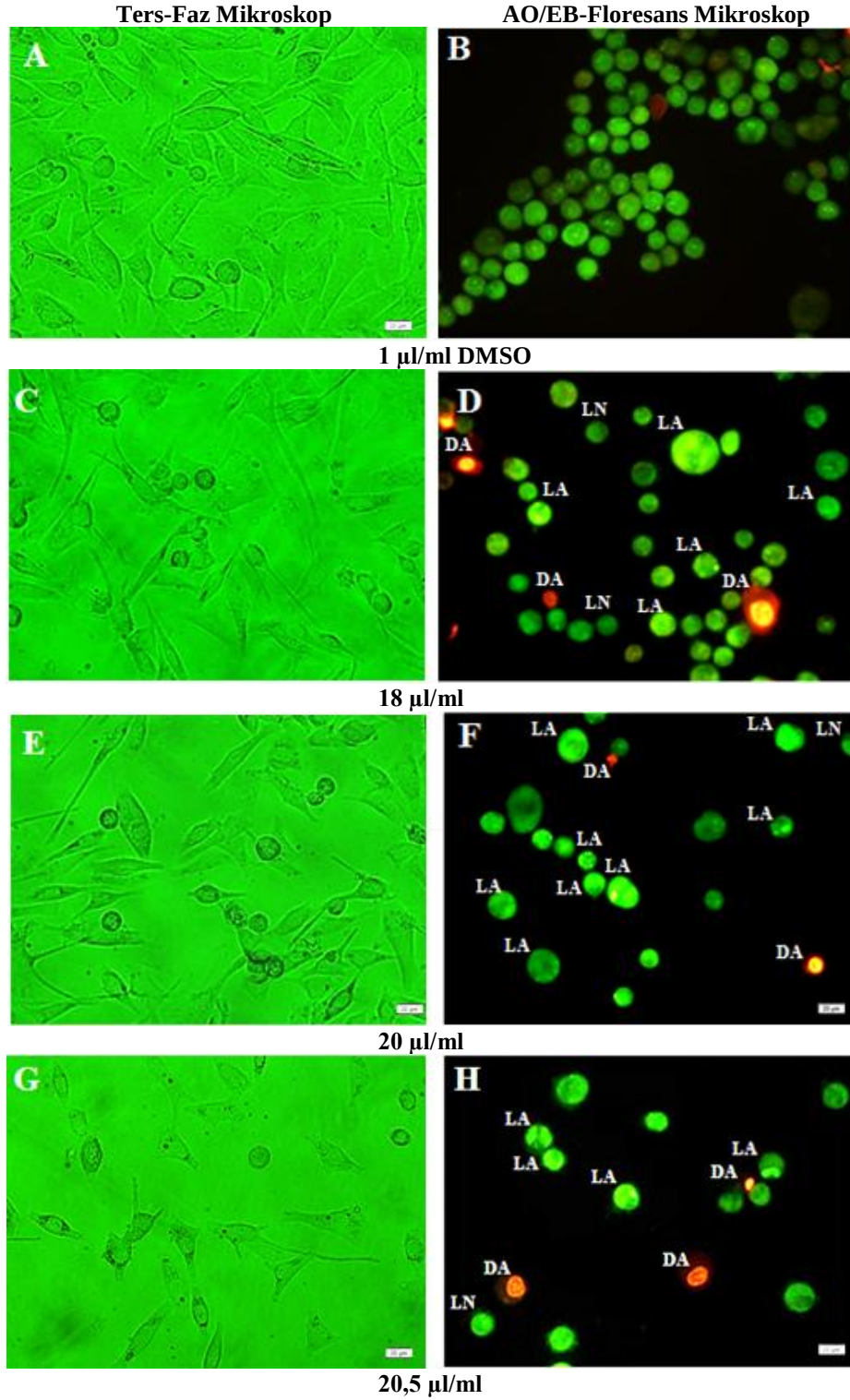
Materyal ve yöntemde belirtildiği gibi, Malme-3M hücrelerine 1 µl/ml DMSO (çözücü kontrol), kakao yağının 21.5, 20 ve 18 µl/ml dilüsyonları ile 48 saat muamele edilen hücreler önce ters-faz mikroskopta incelenmiş, AO/EB çift boyama yapılarak floresan mikroskopta fotoğraflanmıştır (Şekil 3.5).

Ters faz mikroskop görüntüleri incelendiğine; % 0,1DMSO uygulanan hücrelerin plaka yüzeyine yapışık şekilde fibroblastik karakterde morfolojiye sahip oldukları gözlenirken (Şekil 3.5A), kakao yağı muamele edilen örneklerde ise hücre sayısının dilüsyona bağlı olarak azaldığı ve hücrelerin plaka/kuyu yüzeyinden kalkarak yuvarlaklaştıkları, morfolojik olarak deformasyona uğradıkları gözlenmiştir (Şekil 3.5.C, E, G).

Floresans mikroskop görüntülerinde; % 0,1 DMSO uygulanan ve AO/EB ile boyanan Malme-3M hücrelerinin canlı oldukları ve çekirdek morfolojisinin de normal olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.3B). Kakao yağı uygulanan hücrelerin ise yoğunlaşmış ve fragmente çekirdek morfolojisi, çekirdek zarında tomurcuklanma, büzüşme gibi apoptotik özellikler gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 3.5D, F, H).

AO/EB çift boyama ile homojen kromotin dağılımı gösteren, normal çekirdeğe sahip ve yeşil renkte görünen hücreler canlı (LN; live cells, normal nüclei), yoğunlaşmış veya fragmente olmuş kromatine sahip apoptotik çekirdekli parlak yeşil renkli hücreler ise erken apoptotik (LA; live cells, apoptotic nuclei) olarak ifade edilmektedir. Ölü (nekrotik) hücreler (DN; dead cells, normal nuclei); normal çekirdeğe sahip, parlak turuncu ya da kırmızı renkte; geç apoptotik hücreler (DA; dead cells, apoptotic nuclei); oldukça yoğunlaşmış ve fragmente bir kromatine sahip, çekirdekleri parçalanış ya da çekirdek zarı düzensizleşmiş olup parlak kırmızı veya turuncu boyanmaktadır (Duke 2004). Her bir deney en az 2 kez tekrar edilmiş ve toplamda 500-1500 arasında hücre sayılmış ve apoptotik hücre yüzdesi aşağıdaki formülle belirlenmiştir.

$$\text{Apoptotik Hücrelerin Yüzdesi} = \frac{LA+DA}{LN+LA+DN+DA} \times 100$$



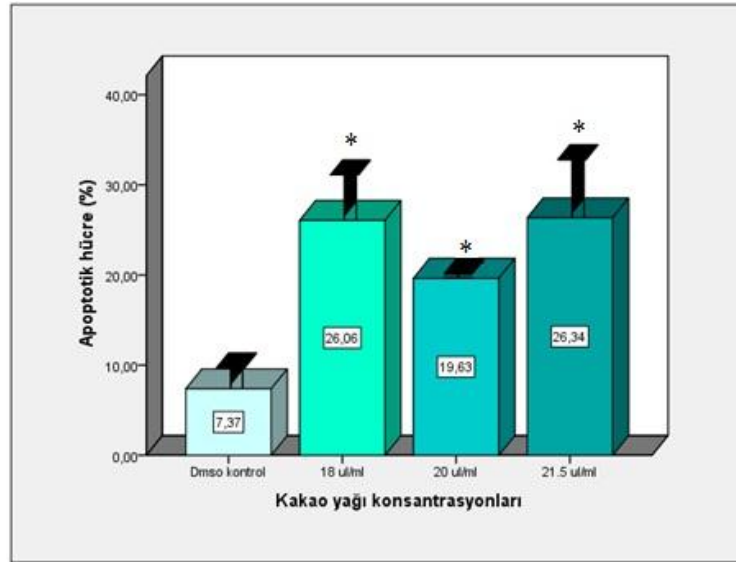
Şekil 3.5. Kakao yağı etkisiyle Malme-3M hücrelerinin morfolojilerinde gözlenen apoptotik değişimler. LA: erken apoptotik hücre, DA: geç apoptotik hücre, LN: normal hücre, büyütme: 400X

Kakao yağının Malme-3M hücreleri üzerindeki 48 saat sonundaki apoptoz yüzdesi, incelenen preparatlarda rastgele seçilmiş alanların incelenip sağlıklı ve apoptotik toplam 500-1500 sayıda hücrenin sayılmasıyla belirlenmiştir. Apoptotik hücre sayılarının çözücü uygulanmış kontrol hücrelerine oranlanmasıyla elde edilen % apoptoz ve % nekroz oranları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Malme-3M hücrelerinde kakao yağının uyardığı apoptoz oranı ve yüzde dağılımı

Test bileşenleri (µl/ml)	Canlı (LN %)	Erken apoptotik (LA %)	Geç apoptotik (DA %)	Ölü/Nekrotik (DN %)
18	72,59	21,53	4,53	1,35
20	79,43	12,95	6,68	0,94
21.5	72,98	22,25	4,09	0,68
DMSO(%0,1)	91,67	6,26	1,11	0,96

Elde edilen veriler sonucunda Malme-3M hücrelerinde uygulanan kakao yağı dilüsyonlarının apoptotik hücre indeksi ise grafiğe dönüştürülmüş ve Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Malme-3M hücrelerinde kakao yağı etkisiyle gözlenen apoptotik indeks (*; p<0,001)

Duke (2004) yöntemine göre formüle edilen apoptotik indeks değerleri incelendiğinde, Malme-3M hücrelerinde 1 µl/ml DMSO etkisiyle gözlenen apoptotik hücre oranı % 7,37’dir. Kakao yağı dilüsyonlarında DMSO kontrole

kıyasla apoptotik hücre oranının yaklaşık % 12-20 arasında arttığı gözlenmiştir. Kakao yağının 18 µl/ml dilüsyonunda apoptotik hücre oranı % 26,06; IC₅₀ değeri olan 20 µl/ml dilüsyonda ise % 19.63 olarak gözlenirken, 21.5 µl/ml dilüsyonda ise apoptotik hücre oranı % 26,34'dür.

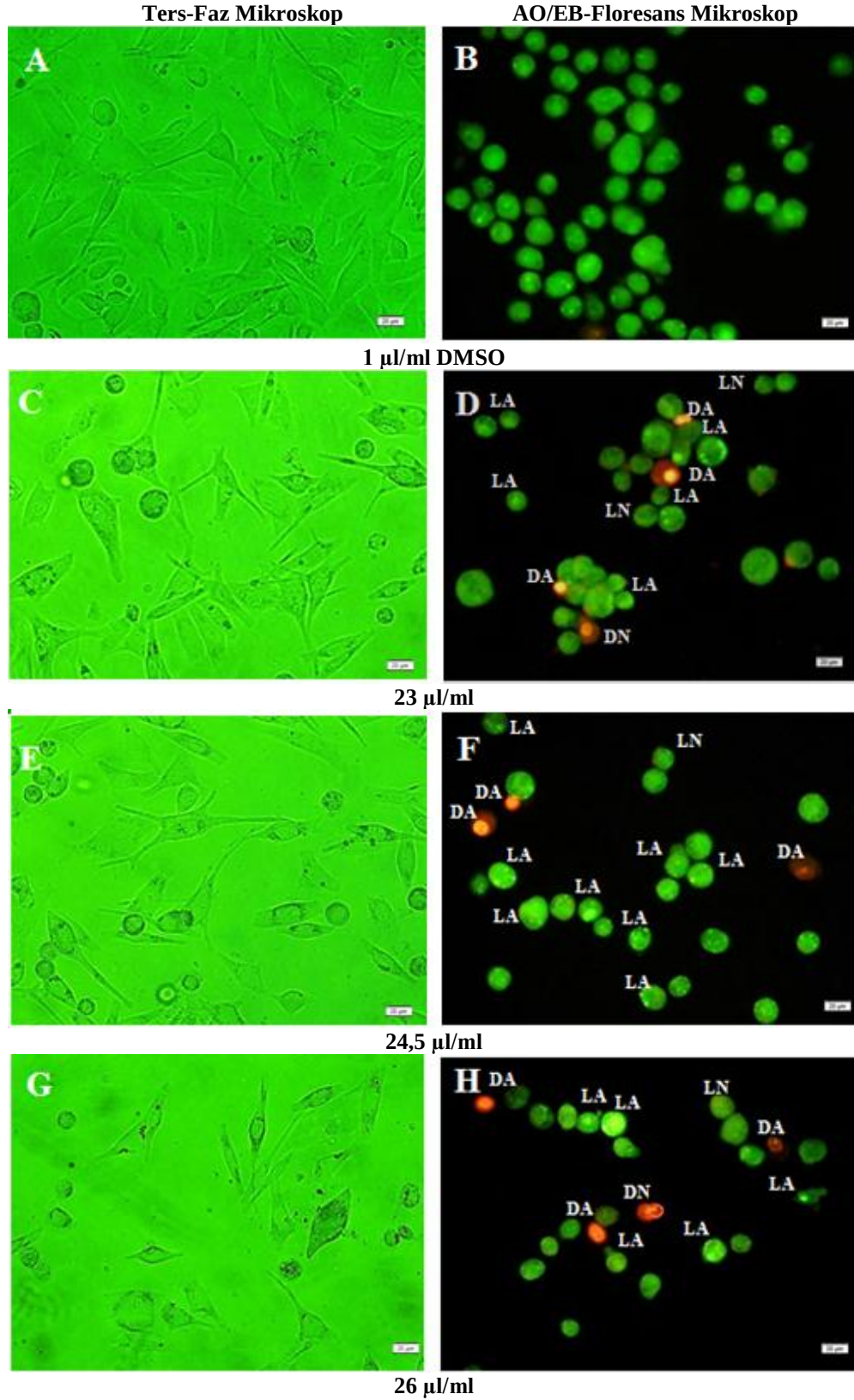
3.3.2. Kayısı yağı

Malme-3M hücreleri 1 µl/ml DMSO ve kayısı yağının 26 µl/ml, 24.5 µl/ml ve 23 µl/ml dilüsyonları ile 48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler önce ters-faz mikroskopta incelenmiş, AO/EB çift boyama ve preperasyon işleminin ardından floresan mikroskopta fotoğraflanmıştır (Şekil 3.7).

Ters-faz mikroskop görüntüleri incelendiğinde; 1 µl/ml DMSO ile muamele edilen hücrelerin (çözücü kontrol) plaka yüzeyinde normal morfoloji gösteren fibroblast görünümüne sahip canlı hücreler oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.7A). Kayısı yağının çeşitli dilüsyonları uygulanan hücrelerin ise dilüsyona bağlı olarak plaka yüzeyi ile bağlantılarının zayıfladığı, yuvarlak morfolojiye sahip hücrelerin sayısının arttığı ve canlı hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.7C, E, G).

Floresans mikroskop görüntülerine bakıldığında; DMSO uygulanmış ve AO/EB ile boyanmış hücrelerin homojen kromatin dağılımı gösteren çekirdek yapısına sahip oldukları gözlenmiştir. Kayısı yağı ile muamele edilmiş Malme-3M hücrelerinin çekirdeklerinde yoğunlaşma, fragmentasyon, hücrelerin sitoplazmalarında büzülme gibi apoptoz ile karakterize olan özellikler gözlenmiştir (Şekil 3.7D, F, H).

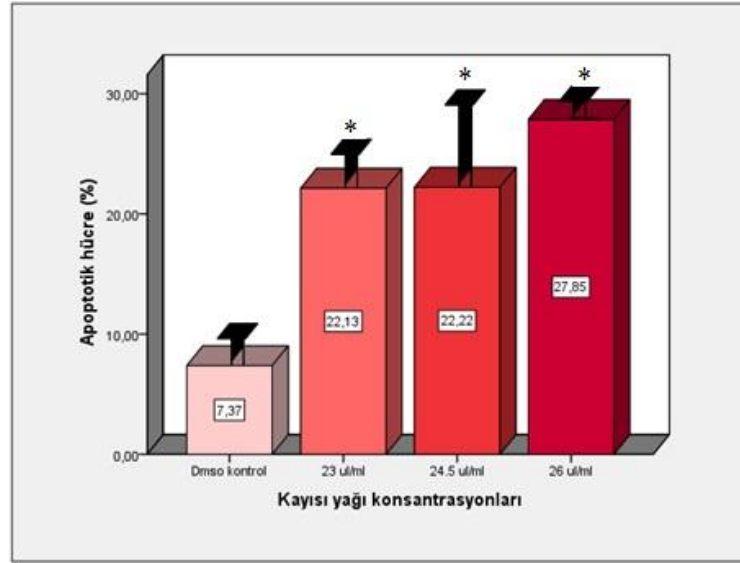
Malme-3M hücrelerinde AO/EB çift boyama deneyi en az 2 kez tekrarlanarak, kayısı yağının her bir dilüsyonu için 500-1500 hücre sayılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda; canlı, erken ve geç apoptotik, nekrotik hücre sayıları ve çözücü (% 0,1 DMSO) kontrole oranlanarak elde edilen apoptoz yüzde oranları Çizelge 3.2'de sunulmuştur. Malme-3M hücrelerinde kayısı yağı etkisiyle gözlenen apoptotik etkiye göre, önceden verilen formül ile hesaplanan apoptotik indeks grafiği dönüştürülmüş ve Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Kayısı yağı etkisiyle Malme-3M hücrelerinin morfolojilerinde gözlenen apoptotik değişimler. LA: erken apoptotik hücre, DA: geç apoptotik hücre, DN: ölü hücre, LN: normal hücre, büyütme: 400X

Çizelge 3.2. Malme-3M hücrelerine kayısı yağının uyardığı apoptoz oranı ve yüzde dağılımı

Test bileşenleri (µl/ml)	Canlı (LN %)	Erken apoptotik (LA %)	Geç apoptotik (DA %)	Ölü/Nekrotik (DN %)
23	77,22	17,45	4,68	0,65
24.5	76,68	19,82	2,91	0,59
26	71,22	23,88	3,97	0,93
DMSO (%0,1)	91,67	6,27	1,12	0,96



Şekil 3.8. Malme-3M hücrelerinde kayısı yağı etkisiyle gözlenen apoptotik indeks (*; p<0,001)

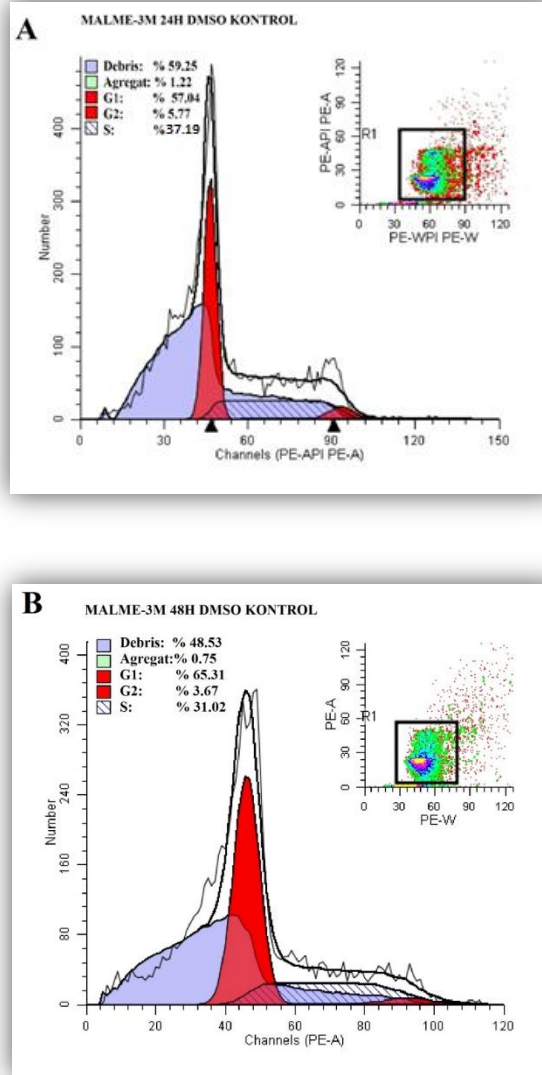
Duke (2004) yöntemine göre elde edilen apoptotik indeks incelendiğinde, DMSO uygulanmış Malme-3M hücrelerinde apoptotik hücre oranı % 7,37'dir. 23 µl/ml kayısı yağının sebep olduğu apoptotik hücre oranı % 22,13 tespit edilmiş, 24.5 µl/ml dilüsyonda ise % 22,22 olarak hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri olan 26 µl/ml dilüsyonunda apoptotik hücre oranı % 27,85'dir.

3.4. Malme-3M Hücrelerinde Hücre Döngüsü Analizi

3.4.1. Kakao yağı

Materyal ve yöntemde anlatıldığı şekilde, Malme-3M hücreleri serum açlığında 24 saat bırakılarak G₀/G₁ evresinde eşitlendikten sonra; hücrelere 1 µl/ml DMSO, kakao yağı için IC₅₀ (20 µl/ml) ve bir alt dilüsyon (18 µl/ml) ile 24

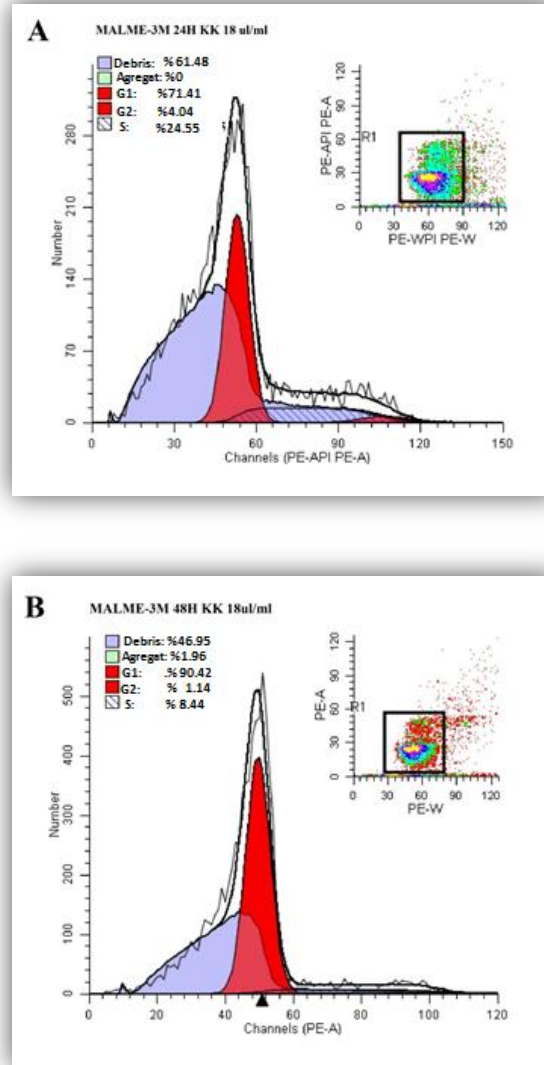
ve 48 saat uygulanmıştır. Malme-3M hücrelerinde kakao yağının hücre döngüsü dağılımı üzerine etkisini belirlemek amacıyla akım sitometri (BD FACSaria) cihazında analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA içerik histogramında G₁, G₂ ve S evresindeki hücre değerleri yüzde olarak belirtilmiştir. 1 µl/ml DMSO (çözücü kontrol) ile muamele edilen hücrelerin akım sitometri sonuçları Şekil 3.9'da kayısı yağı dilüsyonları sonuçları ise Şekil 3.10 ve 3.11'de verilmiştir.



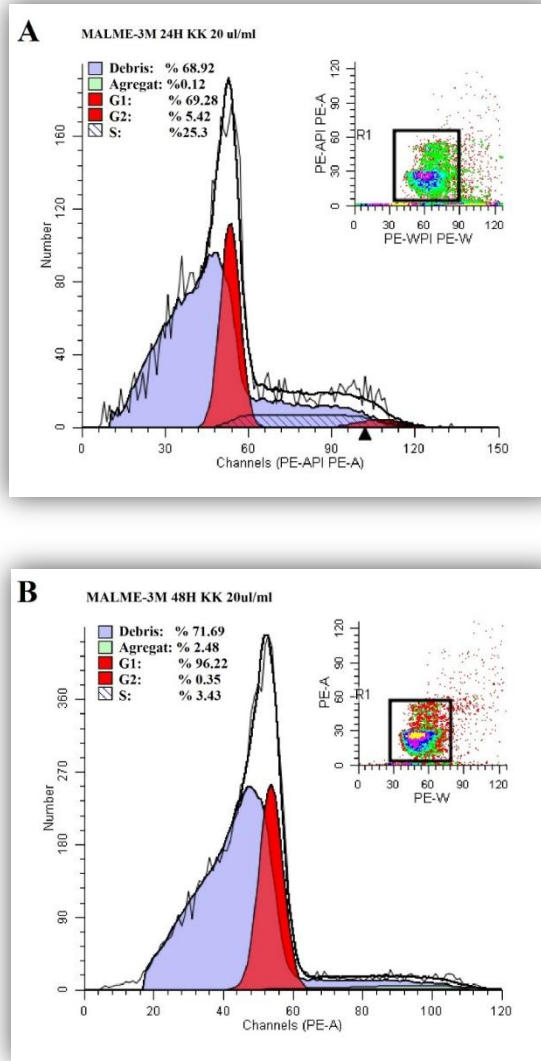
Şekil 3.9. 1 µl/ml DMSO ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı

G₁ evresi: 1 µl/ml DMSO (çözücü kontrol) için 24 ve 48 saat inkübasyonda elde edilen değerler karşılaştırıldığında, 24 saatte G₁ evresinde % 8 oranında artış olmuştur. Çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında ise kakao yağının

24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde G₁ evresinde bekleyen hücrelerin oranında artışa neden olduğu gözlenmektedir. Bu artış, çözücü kontrole göre; 18 µl/ml’de 24 saat için % 14-15, 48 saat için % 25-26 oranında; 20 µl/ml’de ise 24 saat için % 12-13, 48 saat için % 3-4 oranında tespit edilmiştir. S evresi: Kakao yağı uygulanan örneklerde, hücre döngüsünün S evresindeki hücrelerin oranı, çözücüye oranla, 24 ve 48 saatte azalış göstermektedir. Bu azalış zamana ve dilüsyona bağlı olarak farklılık göstermektedir. S evresindeki azalış miktarı, çözücü kontrole göre, 18 µl/ml kakao yağında 24 saat için % 12-13, 48 saat için % 11-12 oranında gözlenirken; 20 µl/ml’de ise 24 saat için % 22-23, 48 saat için % 27-28 oranında tespit edilmiştir.



Şekil 3.10. 18 µl/ml kakao yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı



Şekil 3.11. 20 µl/ml kakao yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı

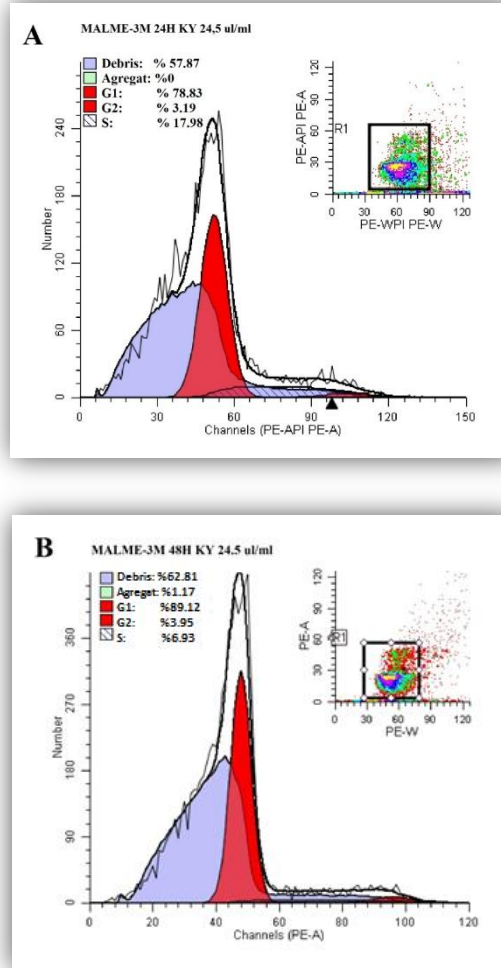
G₂ evresi: Kakao yağının 24 saatte, çözücü kontrole göre, G₂ evresindeki hücrelerin sayısında zayıf bir azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu azalış oranı 18 µl/ml kakao'da % 1-2 oranındayken 20 µl/ml'de % 0-1 olarak gözlenmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde ise 18 µl/ml kakao'da G₂ evresindeki hücre sayısında % 2-3'lik bir azalma gözlenirken, 20 µl/ml'de % 3-3,5 oranında bir azalma gözlenmiştir. % 0,1 DMSO ile 18 µl/ml ve 20 µl/ml kakao yağı'nın Malme-3M hücre döngüsü dağılımı üzerine etkisi, yüzde değerleri olarak Çizelge 3.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. DMSO (1 µl/ml), 18 ve 20 µl/ml kakao yağı uygulanmış Malme-3M hücrelerinde 24 ve 48 saat sonundaki hücre döngüsü analizi

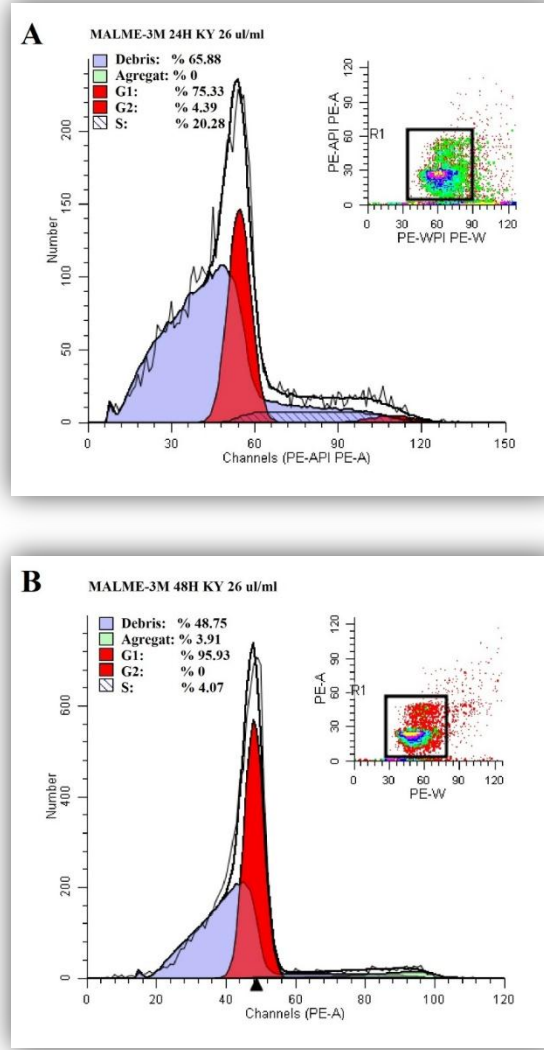
Test bileşenleri µl/ml	24 saat			48 saat			Debris (%)	
	% G1	%G2	% S	% G1	%G2	% S	24 saat	48 saat
18	71.41	4.04	24.55	90.42	1.14	8.44	61.48	46.95
20	69.28	5.42	25.3	96.22	0.35	3.43	68.92	71.69
% 0,1 DMSO	57.04	5.77	37.19	65.31	3.67	31.02	59.25	48.53

3.4.2. Kayısı yağı

DMSO ve 26 ve 24.5 µl/ml kayısı yağıyla 24 ve 48 saat muamele edilmiş Malme-3M hücreleriyle akım sitometri’de DNA analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar DNA histogramında gösterilmiştir (Şekil 3.12, 3.13).



Şekil 3.12. 24.5 µl/ml kayısı yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı



Şekil 3.13. 26 µl/ml kayısı yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde A) 24 saat B) 48 saat sürelerinde akım sitometri ile belirlenen hücre döngüsü dağılımı

G₁ evresi: Kayısı yağının her iki dilüsyonda çözücü kontrole göre G₁ evresinde tutuklanan hücre sayısında artışa neden olduğu gözlenirken, bu artış 24 ve saat için 24.5 µl/ml’de % 15-16, 48 saat için ise % 23-24 olarak tespit edilmiştir. 26 µl/ml kayısı uygulanan örneklerin analizine bakıldığında, G₁ evresindeki tutuklanmadaki artışın 24 saat için % 18-19 ve 48 saat için % 30-31 oranında olduğu gözlenmiştir. S evresi: Kayısı yağı uygulanmış örneklerde, her iki inkübasyon süresinde de S evresinde bulunan hücrelerin oranı, çözücü kontrole göre azalmıştır. 24.5 µl/ml kayısı yağı uygulanan örneklerde, S evresindeki hücrelerin sayısında, 24 saat için % 34 ve 48 saat için % 24-25 oranında azalma

olduğu dikkati çekmektedir. 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan örneklerde ise S evresindeki hücre sayısında, 24 saatte % 16-17, 48 saatte % 26-27 oranında azalma gözlenmiştir. Kayısı yağının 24 saat inkübasyonunun, G₂ evresinde bulunan hücre sayısında kontrole göre bir azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu azalmanın oranı, 24.5 µl/ml kayısı yağı uygulanan örnekte % 2-3 oranındayken 26 µl/ml’de % 1-2 olarak gözlenmiştir. 48 saatte ise 24.5 µl/ml dilüsyonda G₂ evresinde bulunan hücre sayısında % 0-1 oranında artış gözlenirken 26 µl/ml’de % 3-4 oranında azalış gözlenmiştir. 1 µl/ml DMSO (çözücü kontrol) ve kayısı yağının 24.5 µl/ml ve 26 µl/ml dilüsyonları ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucunda tespit edilen hücre döngüsü değerleri Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. DMSO (1 µl/ml), 24.5 µl/ml ve 26 µl/ml kayısı yağı uygulanmış Malme-3M hücrelerinde 24 ve 48 saat sonundaki hücre döngüsü analizi

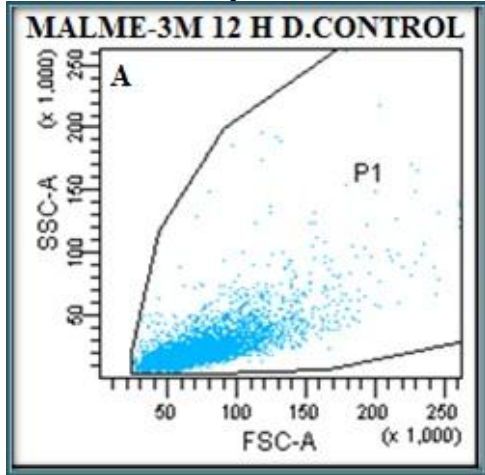
Test bileşenleri µl/ml	24 saat			48 saat			Debris (%)	
	% G1	% G2	% S	% G1	% G2	% S	24 saat	48 saat
24.5	78.83	3.19	17.98	89.12	3.95	6.93	57.87	62.81
26	75.33	4.39	20.28	95.93	0	4.07	65.88	48.75
% 0,1 DMSO	57.04	5.77	37.19	65.31	3.67	31.02	59.25	48.53

3.5. Malme-3M Hücrelerinde Aktif Kaspaz-2 Enzim Seviyesinin Belirlenmesi

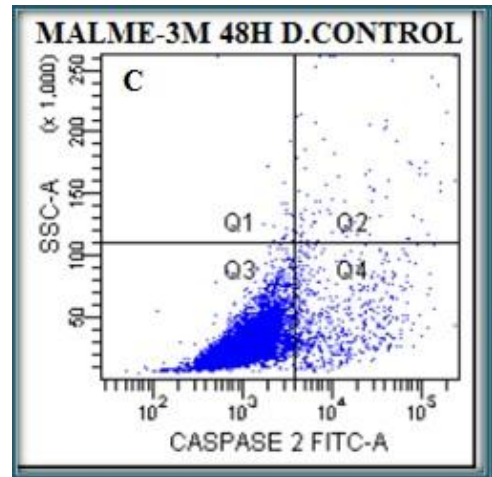
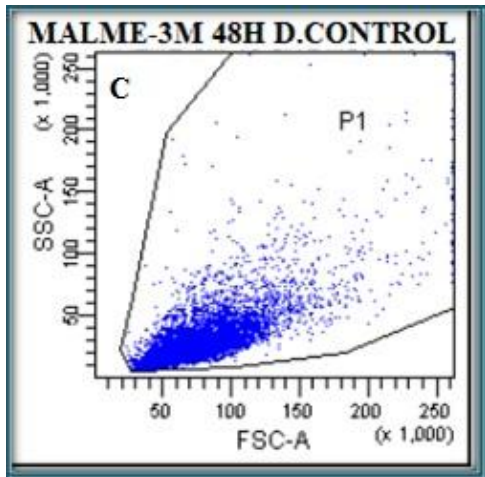
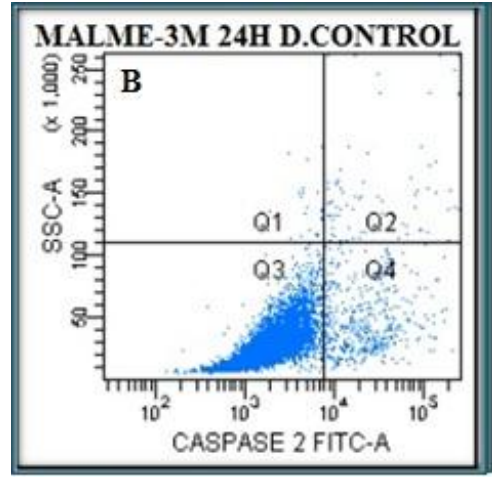
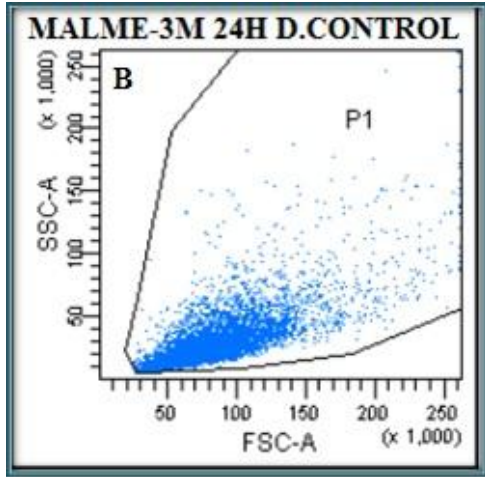
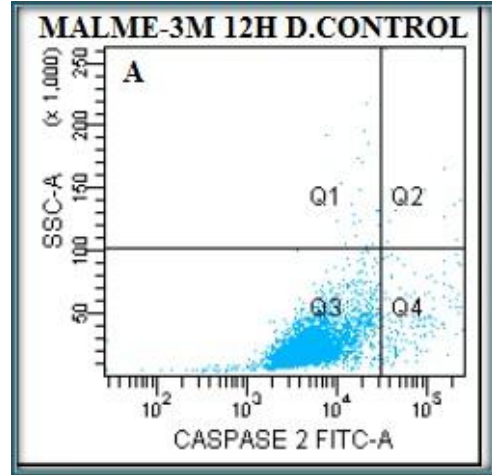
3.5.1. Kakao yağı

Malme-3M hücrelerinde kakao yağının aktif kaspaz-2 enzim seviyesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 1 µl/ml DMSO (çözücü kontrol), kakao yağının IC₅₀ değeri 20 µl/ml ve bir üst dilüsyon 21.5 µl/ml ile 12, 24 ve 48 saat sürelerince uygulanmıştır. Hücreler FITC işaretli kaspaz-2 inhibitörü (VDVAD-FMK) ile inkübe edilerek hücre içerisinde aktif durumda olan kaspaz-2 enzimleri ile bağlanması amaçlanmış, akım sitometride analiz edilerek, aktif kaspaz-2 enzim seviyeleri belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.14, 15’de sunulmuştur.

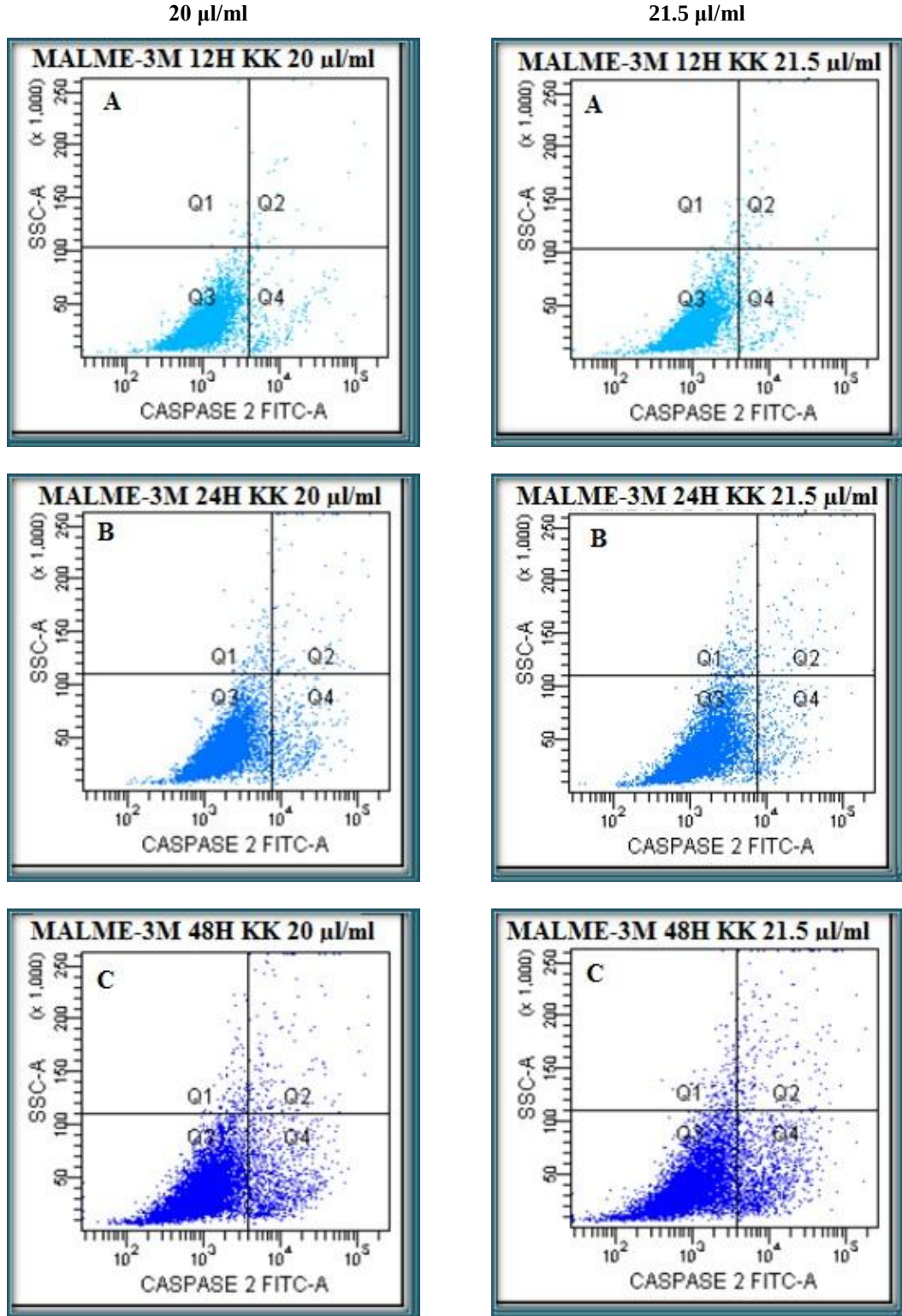
Kapı



Analiz Kadranı



Şekil 3.14. 1 μ l/ml DMSO uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim.



Şekil 3.15. 20 ve 21.5 $\mu\text{l/ml}$ kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim

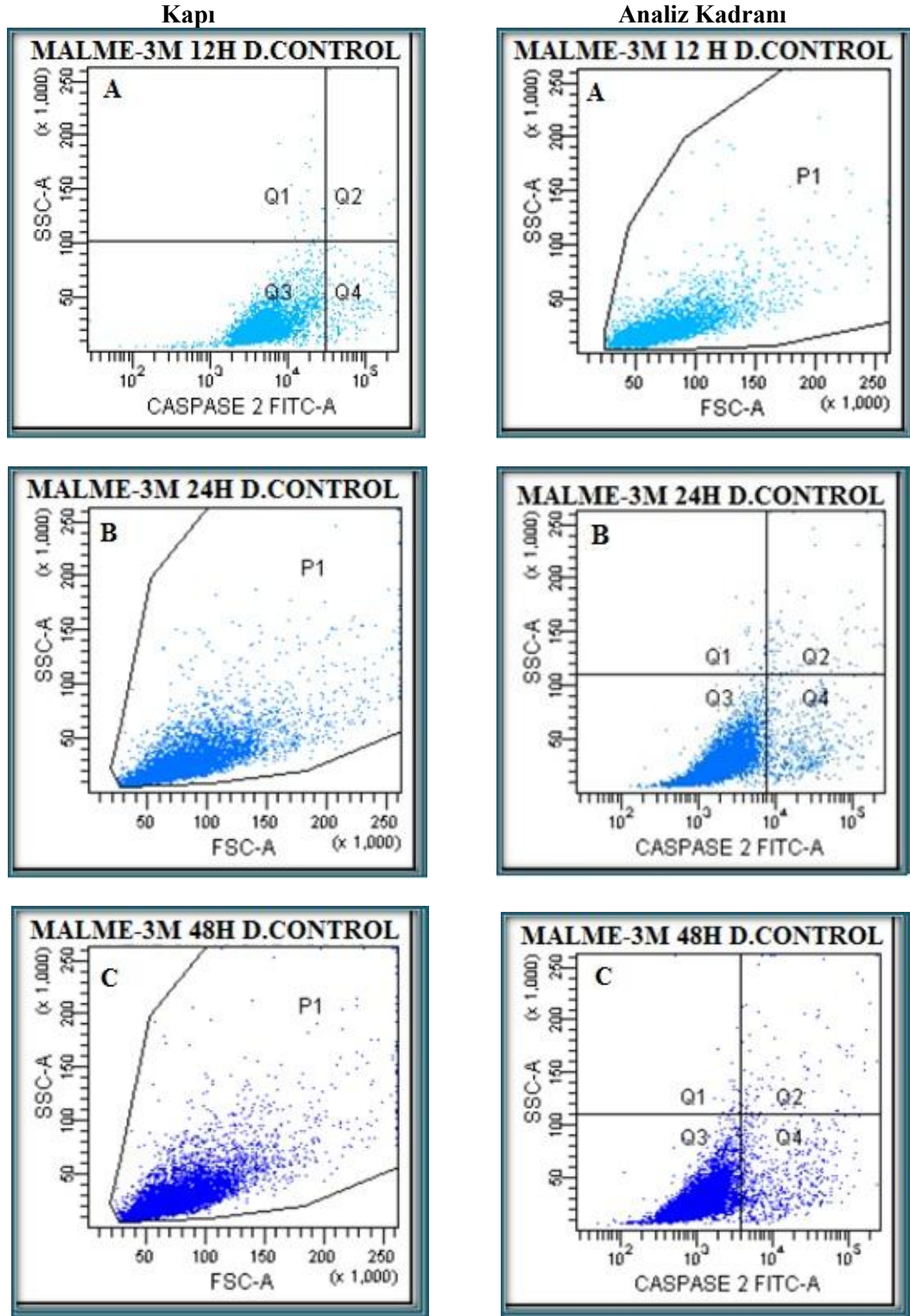
Çizelge 3.5. Malme-3M hücrelerinde 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde 1 µl/ml DMSO; 20 ve 21.5 µl/ml kakao yağı ile muamele sonrasında kaspaz-2 enzim düzeyleri

	12 SAAT			24 SAAT			48 SAAT		
%	DMSO 1 µl/ml	20 µl/ml	21.5 µl/ml	DMSO 1 µl/ml	20 µl/ml	21.5 µl/ml	DMSO 1µl/ml	20 µl/ml	21.5 µl/ml
Q1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.8	1.6	0.2	1.0	1.2
Q2	0.2	0.4	0.5	0.8	0.8	0.9	0.9	1.5	1.9
Q3	98	97.4	97	94.3	94.4	94.8	92.5	88	85.8
Q4	1.6	2.1	2.3	4.7	3.9	2.7	6.4	9.6	11.1

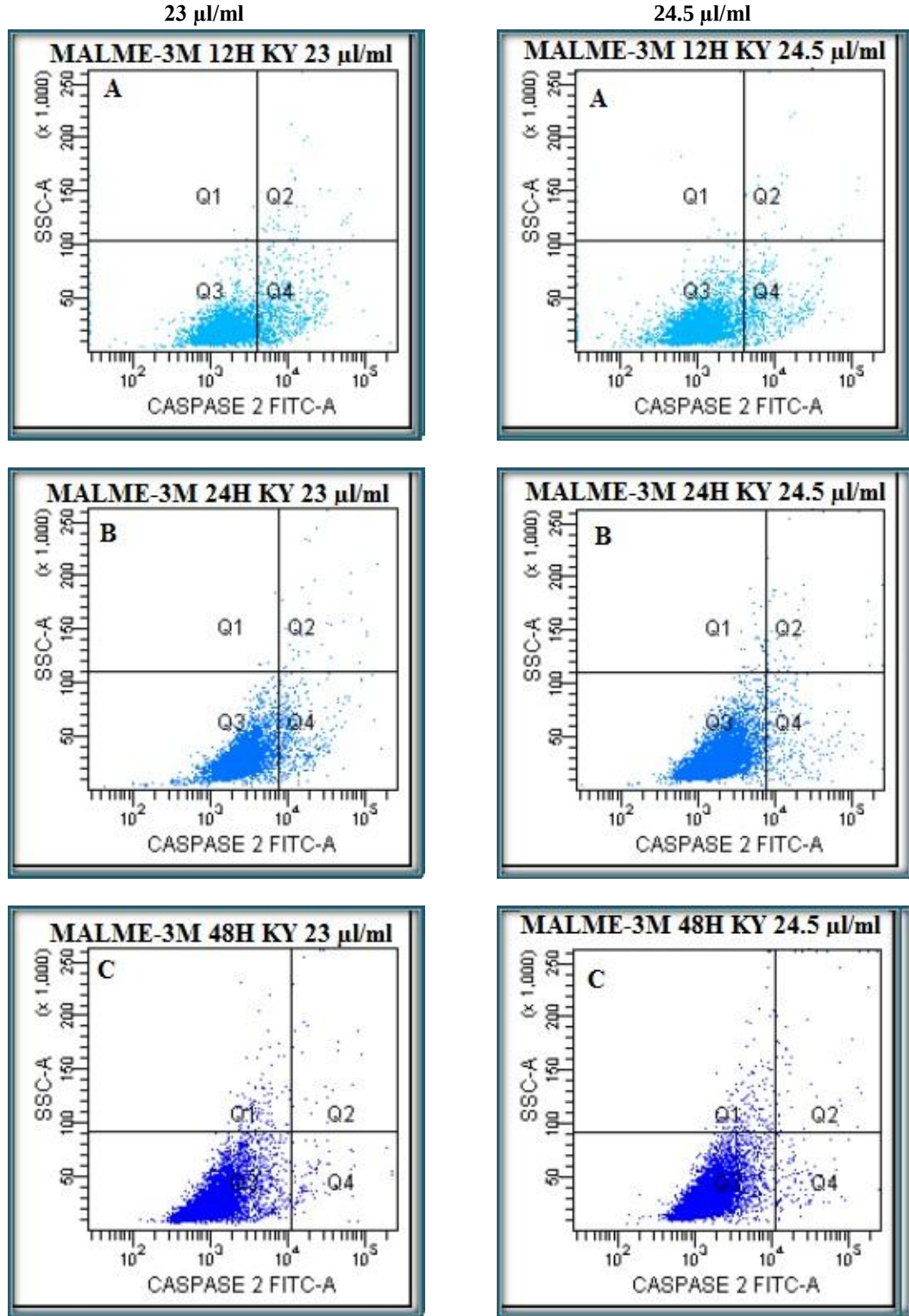
Aktif kaspaz-2 enzim seviyesinin belirlenmesi amacıyla, akım sitometri cihazında, 4 alanlı kadrana sahip noktasal grafik üzerinde analiz yapılmıştır. Q1 ve Q2 alanında saçılım gösteren hücreler bulunduğundan, verilerin değerlendirilmesi Q3 (inaktif kaspaz-2) ve Q4 (aktif kaspaz-2) alanlarında bulunan hücre yüzdelerine göre yapılmıştır. Bu doğrultuda, akım sitometri analizinden elde edilen veriler incelendiğinde; 12 saatlik 20 ve 21.5 µl/ml kakao yağı uygulanmış hücrelerde aktif kaspaz-2 seviyelerinde çözücü kontrole oranla iki katından daha az bir artış olduğu belirlenirken, 24 saatte kaspaz-2 seviyesinde zayıf bir azalma dikkati çekmiştir (Şekil 3.15.A ve B, Çizelge 3.5). 48 saatte; aktif kaspaz-2 seviyesinde çözücü kontrole oranla 20 µl/ml kakao uygulanan örnekte yaklaşık % 3-4 oranında, 21.5 µl/ml kakao uygulananda ise yaklaşık % 4-5 oranında zayıf bir artış olduğu gözlenmemiştir.

3.5.2. Kayısı yağı

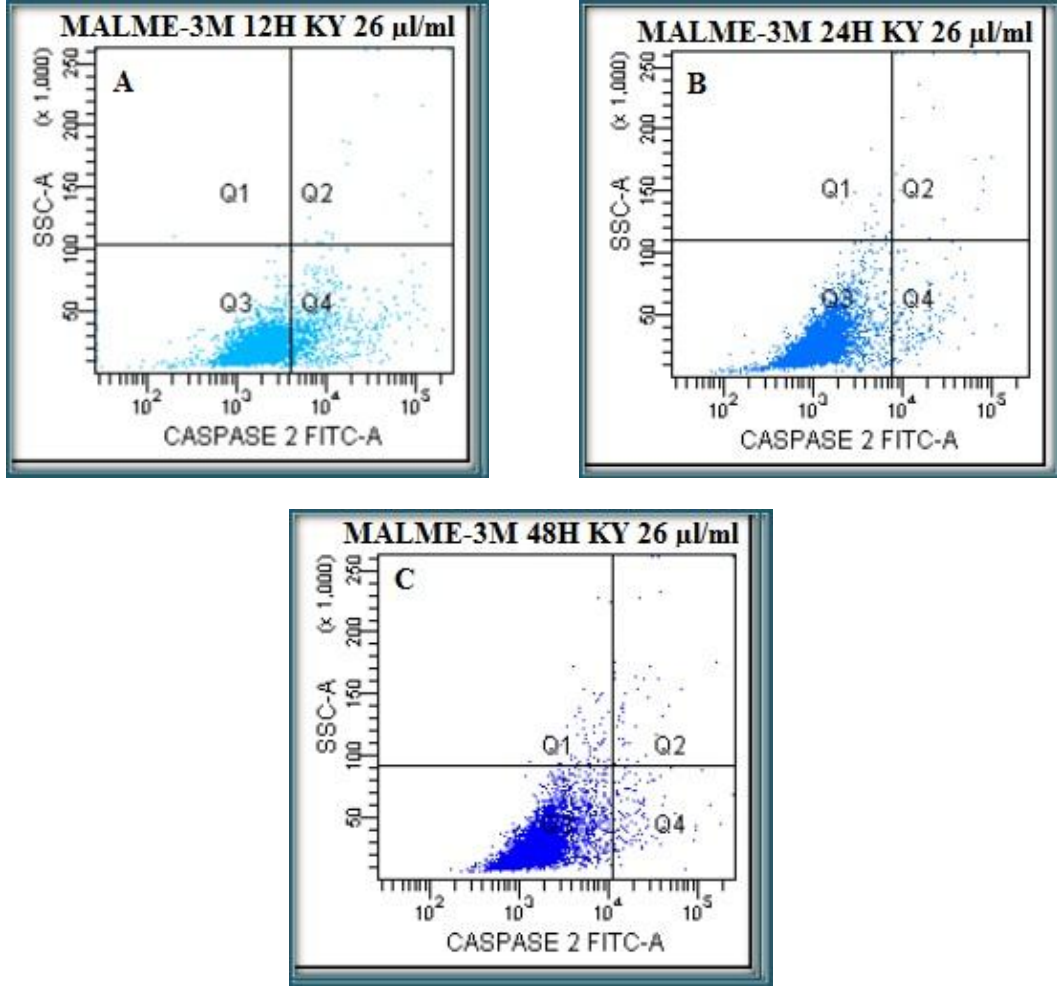
Malme-3M hücrelerine kayısı yağının aktif kaspaz-2 enzim seviyesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 1 µl/ml DMSO (çözücü kontrol), 26, 24.5 ve 23 µl/ml kayısı yağı dilüsyonları 12, 24 ve 48 saat uygulanmıştır. Hücre içerisinde aktif kaspaz-2 enzim seviyelerinin tespit edilmesi için akım sitometride analiz edilmiştir (Şekil 3.16, 17, 18).



Şekil 3.16. 1 µl/ml DMSO uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim



Şekil 3.17. 23 ve 24.5 $\mu\text{l/ml}$ kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim



Şekil 3.18. 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesindeki değişim

Çizelge 3.6 incelendiğinde; 24 ve 48 saat 26, 24.5 ve 23 µl/ml kayısı yağı uygulanan hücrelerde aktif kaspaz-2 seviyesinde kontrole oranla önemli bir değişim gözlenmemiştir. 12 saatte ise 24.5 µl/ml dilüsyonunda % 3-4 oranında, 26 ve 24.5 µl/ml’de ise yaklaşık % 5-6 oranında zayıf bir artış gözlenmiştir.

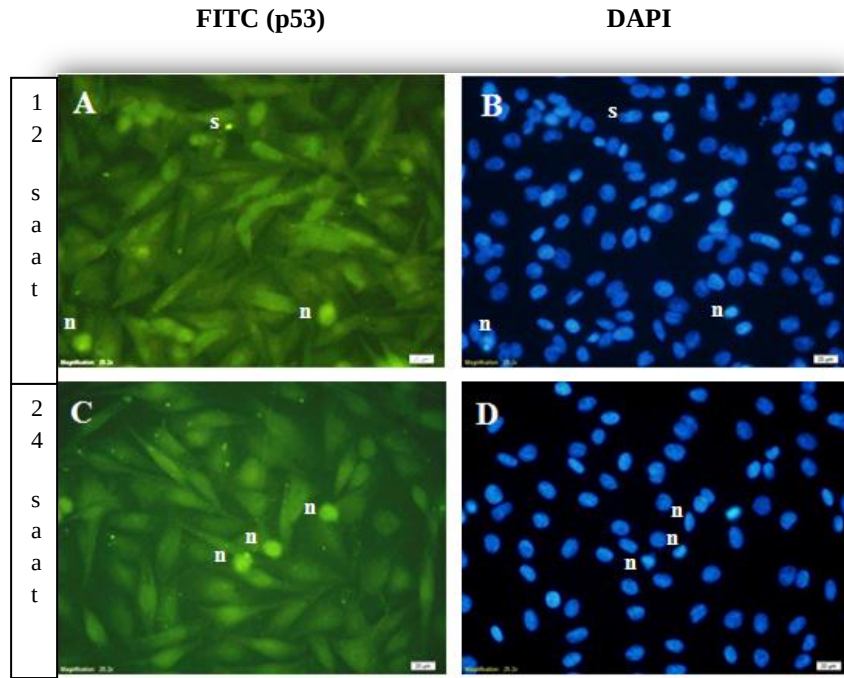
Çizelge 3.6. Malme-3M hücrelerinde 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde 1 µl/ml DMSO; 23, 24.5 ve 26 µl/ml kayısı yağı ile muamele sonrasında kaspaz-2 enzim düzeyleri

	12 SAAT				24 SAAT				48 SAAT			
%	DMSO 1 µl/ml	23 µl/ml	24.5 µl/ml	26 µl/ml	DMSO 1 µl/ml	23 µl/ml	24.5 µl/ml	26 µl/ml	DMSO 1 µl/ml	23 µl/ml	24.5 µl/ml	26 µl/ml
Q1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	1.0	1.5	0.6
Q2	0.2	0.5	0.3	0.2	0.8	0.4	0.5	0.2	0.6	0.2	0.5	0.5
Q3	98	92.3	94.9	92.4	94.3	95.5	97	98.3	94.9	97.9	97.1	97.6
Q4	1.6	7.2	4.7	7.3	4.7	4.1	2.3	1.3	4.0	0.9	1.0	1.3

3.6. Malme-3M Hücrelerinde p53 Proteininin Sentezi ve lokalizasyonu

3.6.1. Kakao yağı

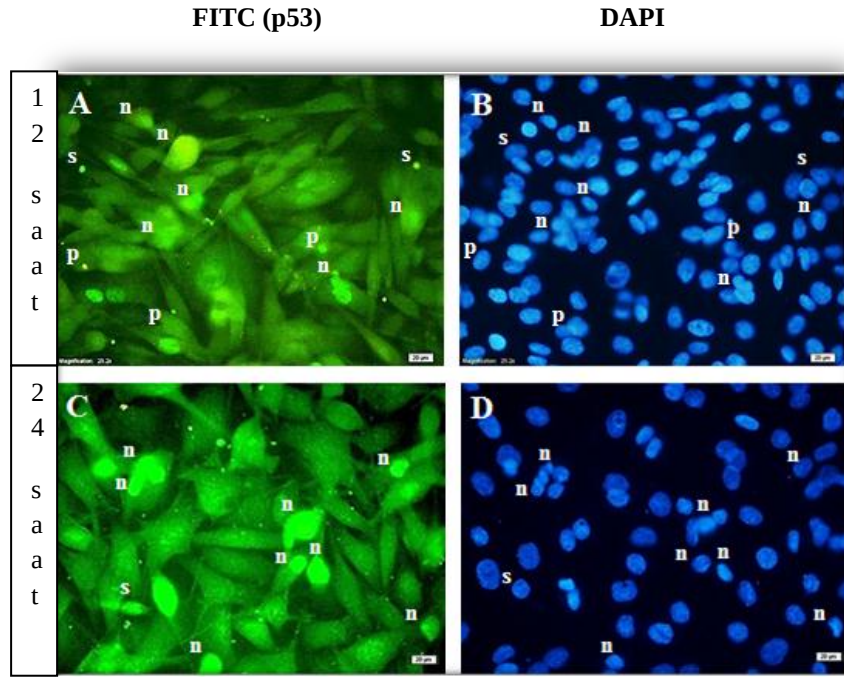
İmmunofloresan işaretleme yöntemi ile kakao yağının Malme-3M hücrelerinde p53 protein miktarı üzerine etkisi ve proteinin hücre içindeki konumu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; lamel üzerinde büyütülen Malme-3M hücrelerine 12 ve 24 saat DMSO ve 18, 20 ve 21.5 µl/ml kakao yağı uygulanmıştır. p53 monoklonal primer antikoru ve FITC işaretli ikincil antikorun uygulamasının ardından çekirdek boyanması için DAPI floresan boya uygulanmıştır. Floresan mikroskopta FITC için WB ve DAPI için NU filtreleri ile fotoğraflanmıştır (Şekil 19, 20, 21, 22).



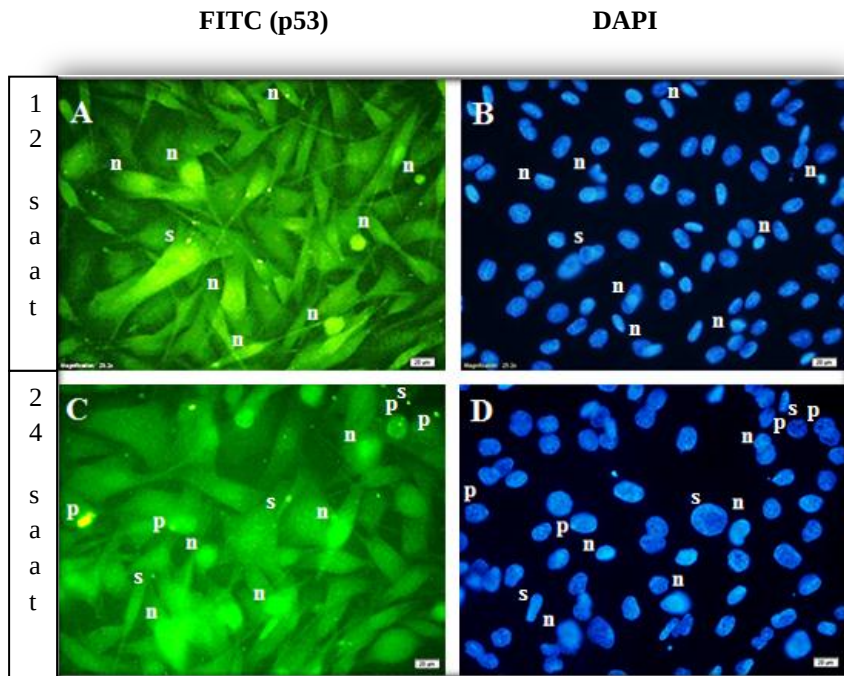
Şekil 3.19. 1 µl/ml DMSO uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi n: çekirdekte p: çekirdek çevresinde s: sitoplazmada,, büyütme 400X

p53 antikorunun bağlandığı hücre içi p53 proteini sarı-yeşil ışımlar halinde görülmektedir. Hücrenin DNA'sını boyayan DAPI boyası ile boyanarak hücrenin çekirdek-sitoplazma ayırımı gösterilmekte ve proteinin hücre içindeki konumu tespit edilmektedir. 12 ve 24 saat DMSO uygulanan Malme-3M

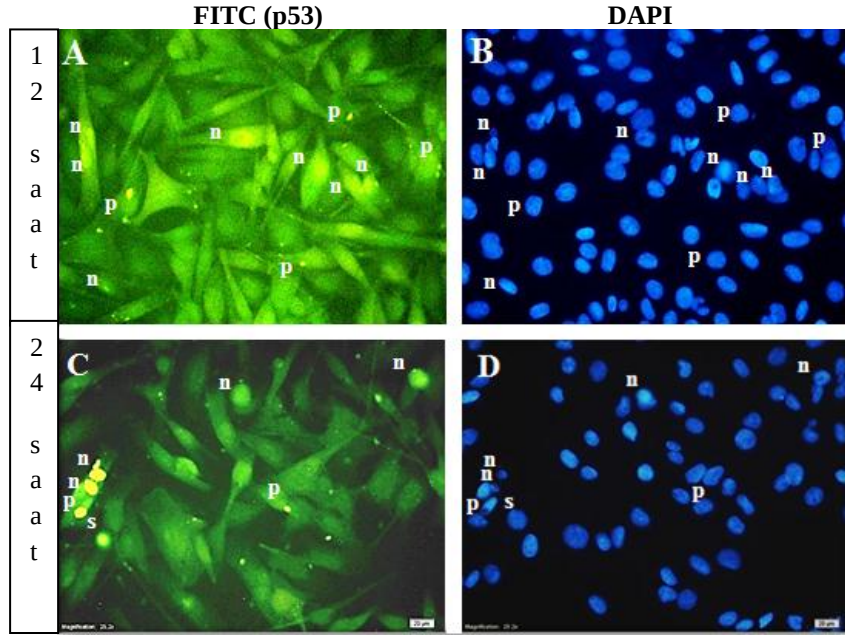
hücrelerinde, FITC işaretli p53 antikor sinyali, az sayıda hücrede, düşük şiddette ve çoğunlukla sitoplazmada yerleşmiş olarak gözlenmiştir (Şekil 3.19.A ve C)



Şekil 3.20. 18 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi, n: çekirdekte p: çekirdek çevresinde s: sitoplazmada, büyütme 400X

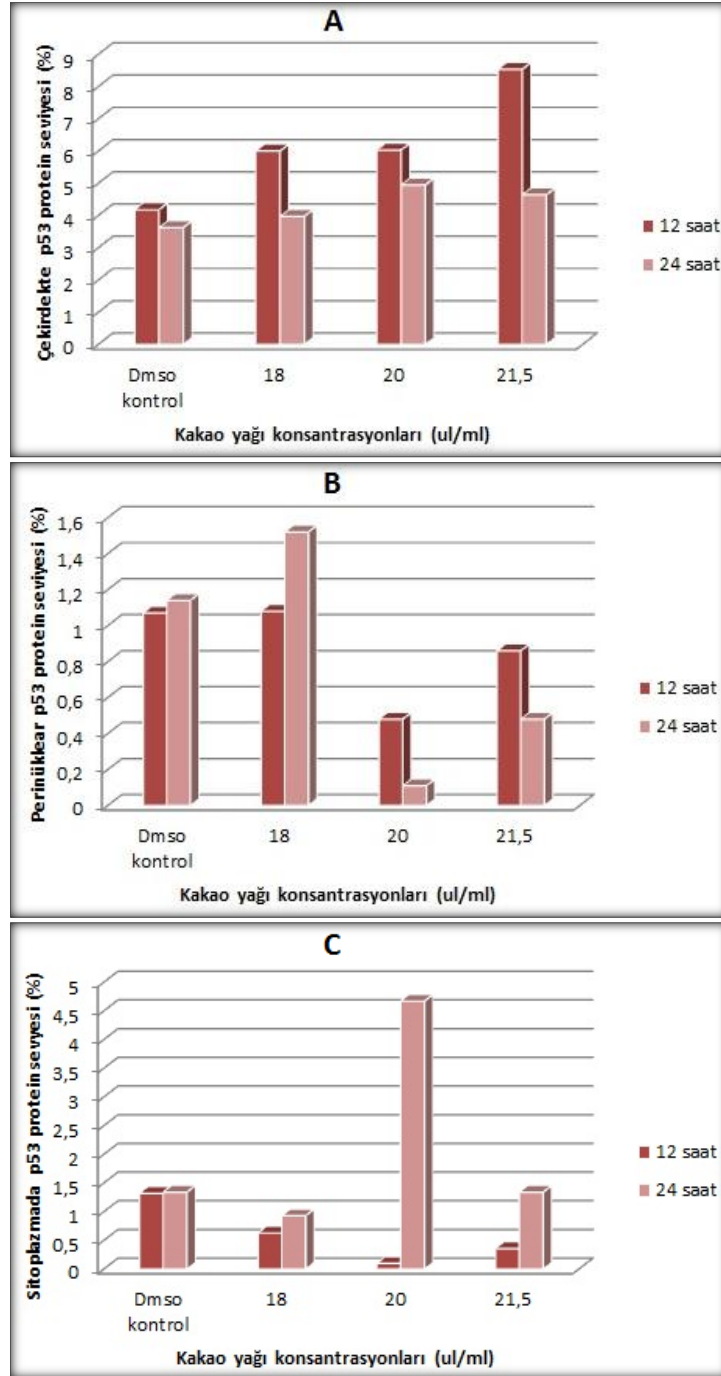


Şekil 3.21. 20 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi, n: çekirdekte p: çekirdek çevresinde s: sitoplazmada, büyütme 400X



Şekil 3.22. 21.5 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi, n: çekirdekte p: çekirdek çevresinde s: sitoplazmada, büyütme 400X

12 ve 24 saat sürelerince 18, 20 ve 21.5 µl/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde DMSO kontrole kıyasla çekirdekte, çekirdek çevresinde (perinükleer) ve sitoplazmada yerleşmiş olan p53 protein miktarında belirgin şekilde artış gözlenmiştir (Şekil 3.20, 21, 22). Çekirdekte yerleşim gösteren p53 protein sinyali, kakao yağının dilüsyonuna bağlı olarak artış göstermiştir. Ayrıca; 12 saatteki çekirdek p53 protein sinyali (Şekil 3.20.A-B; 3.21.A-B; 3.22.A-B), 24 saate göre (Şekil 3.20.C-D; 3.21.C-D; 3.22.C-D) daha yüksek seviyede tespit edilmiştir.



Şekil 3.23. 12 ve 24 saat 1 μ l/ml DMSO; 18, 20 ve 21.5 μ l/ml kakao yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 protein miktarı (% oranları)

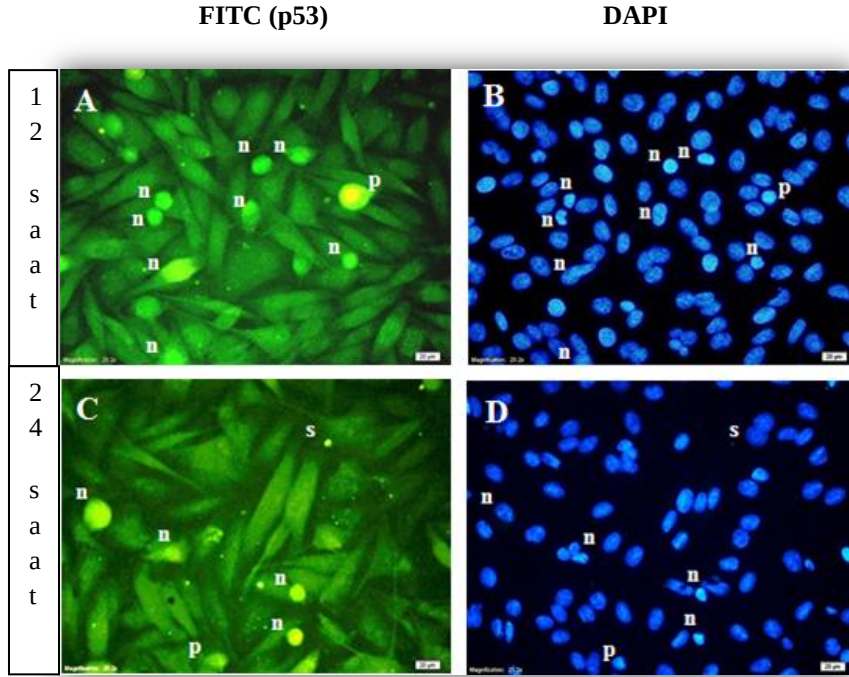
Çizelge 3.7. Malme-3M hücrelerinde kakao yağının p53 seviyesi üzerine etkisi

P53 µl/ml	Çekirdek (%)		Perinüklear (%)		Sitoplazma (%)	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
DMSO (1)	4,18	3,62	1,07	1,14	1,32	1,34
18	6,00	3,97	1,08	1,52	0,63	0,93
20	6,03	4,95	0,48	0,11	0,1	4,67
21,5	8,53	4,64	0,86	0,48	0,36	1,34

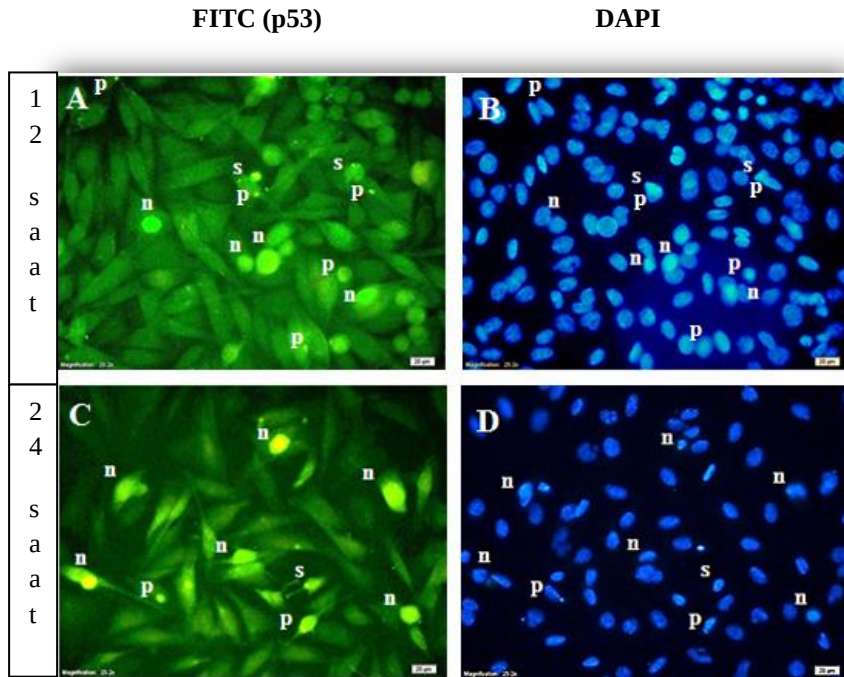
DMSO kontrol verileriyle kıyaslandığında, kakao uygulanmış Malme-3M hücrelerinin çekirdeğinde yoğunlaşmış p53 proteininin miktarı, 24 saate oranla, 12 saatte doza bağlı bir artış gösterdiği Şekil 3.23.A ve Çizelge 3.7’de görülmektedir. 18 µl/ml kakao yağı uygulanan hücrelerde 12. saatte, perinüklear alanda tespit edilen p53 protein seviyesinin 24 saate kıyasla daha yüksek oranda olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.23B). Sitoplazmada yerleşim gösteren p53 protein seviyesinde ise 18 ile 21.5 µl/ml kakao yağı uygulanan hücrelerde, kontrole yakın değerlerde belirlenmiş, 20 µl/ml kakao yağı dilüsyonunda ise belirgin seviyede bir artış olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 3.23C).

3.6.2. Kayısı yağı

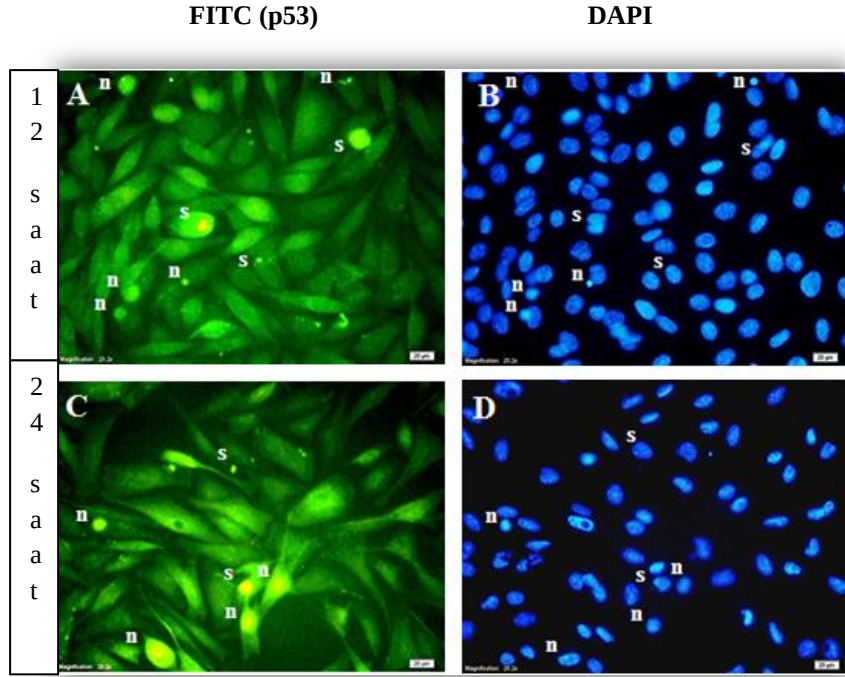
Malme-3M hücrelerinde kayısı yağının p53 protein miktarı ve hücre içindeki konumu İmmunofloresan işaretleme yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; 12 ve 24 saat boyunca 23, 24.5 ve 26 µl/ml kayısı yağı uygulanmış Malme-3M hücreleri p53 monoklonal antikoru ve FITC işaretli ikincil antikoru ile işaretlenmiştir. DAPI floresan boya ile çekirdekleri de boyanan hücreler, floresan mikroskopta FITC için WB ve DAPI için NU filtreleri ile fotoğraflama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 24, 25, 26).



Sekil 3.24. 23 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi, n: çekirdekte p: çekirdek çevresinde s: sitoplazmada, büyütme 400X



Sekil 3.25. 24.5 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M p53 proteinin hücre içi yerleşimi, n: çekirdekte p: çekirdek çevresinde s: sitoplazmada, büyütme 400X

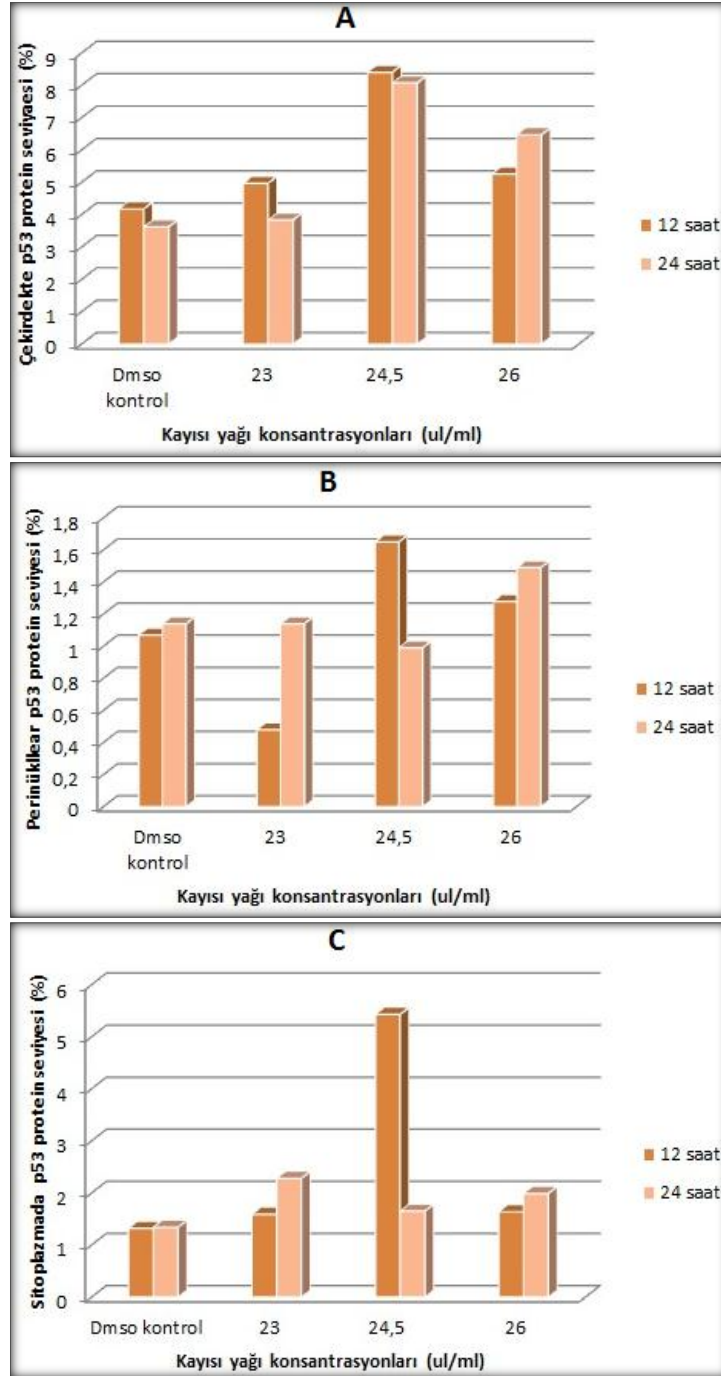


Sekil 3.26. 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 proteinin hücre içi yerleşimi, n: çekirdekte p: çekirdek çevresinde s: sitoplazmada, büyütme 400X

12 ve 24 saat boyunca 24.5 µl/ml kayısı yağı uygulanan hücrelerdeki p53 proteinin çekirdekte yerleşim gösterdiği (Şekil 3.25A, B, C, D) ve 23, 26 µl/ml dilüsyonlarına kıyasla (Şekil 3.24A, B, C, D, 26A, B, C, D) daha yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. 12 saat 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan hücreler incelendiğinde, p53 protein sinyalinin çözücü kontrolün yaklaşık iki katı şiddette ve perinükleolar alanda ve sitoplazmada yoğunlaştığı dikkati çekmiştir.

Çizelge 3.8. Malme-3M hücrelerinde kayısı yağının p53 seviyesi üzerine etkisi

P53	Çekirdek (%)		Perinükleolar (%)		Sitoplazma (%)	
µl/ml	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
DMSO (1)	4,18	3,62	1,07	1,14	1,32	1,34
23	4,97	3,83	0,48	1,14	1,59	2,28
24,5	8,40	8,07	1,65	0,99	5,43	1,65
26	5,25	6,47	1,28	1,49	5,25	6,47



Sekil 3.27. 12 ve 24 saat 1 µl/ml DMSO; 23, 24.5 ve 26 µl/ml kayısı yağı uygulanan Malme-3M hücrelerinde p53 protein miktarı (% oranları)

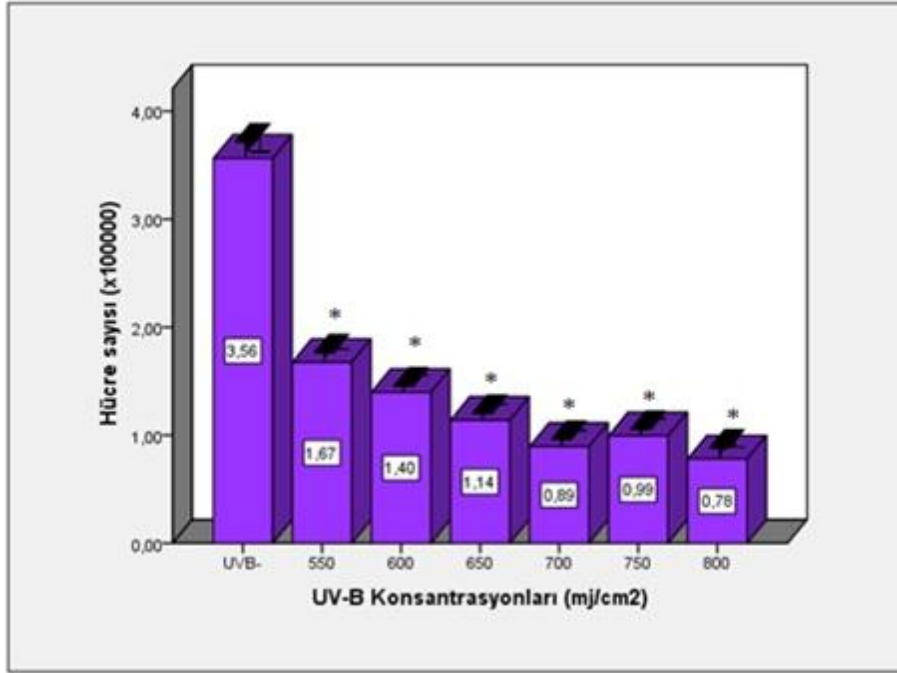
Şekil 3.27A ve Çizelge 3.8 incelendiğinde; hücrelere hem 12 hem de 24 saat süreyle 24.5µl/ml kayısı yağı uygulandığında, çekirdekte bulunan p53 protein miktarı yaklaşık iki katı artarken, 23 µl/ml’de herhangi bir artış gözlenmemiştir. 12 saatte 23 ve 24.5 µl/ml kayısı verilen hücrelerdeki p53 proteini kontrole yakın

miktarda ve perinükleer alanda gözlenmiştir, 26 µl/ml dilüsyonunda ise miktarında belirgin bir artış tespit edilmiştir (Şekil 3.27B). 24 saatte ise 23 µl/ml kayısı yağı uygulanan hücreler kontrole yakın miktarda ve perinükleer bölgede p53 proteini içerirken, 24.5 µl/ml uygulananlarda ise zayıf bir azalış olduğu belirlenmiştir. 26 µl/ml kayısı verilen hücrede ise, yine perinükleer alandaki p53 miktarında zayıf bir artış gözlenmiştir. 12 saat 24.5 µl/ml kayısı uygulanmış hücrelerde sitoplazmadaki p53 proteininde bir artış gözlenirken diğer dilüsyonların uygulandığı hücrelerde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.27C).

3.7. UV-B ışınlarının CRL-2120 Hücreleri üzerine etkisi

3.7.1. UV-B ışınlarının CRL-2120 hücrelerinin canlılığına etkisi

Sağlıklı deri hücrelerinin (CRL-2120) UV-B ışınlarına karşı olan duyarlılığının ve bu hücrelerde kakao ve kayısı yağlarının UV-B ışınlarıyla kombine etkilerinin tespit edilebilmesi amacıyla; materyal yöntem’de açıklandığı şekilde, CRL-2120 hücreler petri yüzeylerinde büyütülmüş ve farklı dozlarda UV-B ışınları uygulanmıştır. Kontrol grubu hücrelere UV-B uygulamamıştır. UV-B maruziyetinden 24 saat sonra, hücreler tripan mavisi ile boyanarak Cedex X-Smart hücre sayım cihazında sayılmış, UV-B doz artışına paralel hücre sayısının azaldığı görülmüş ve UV-B dozları için IC₅₀ değeri yaklaşık 550 mj/cm² olarak belirlenmiştir (Şekil 3.28). Uçucu yağlar ile kombine olarak uygulanacak UV-B dozları olarak, 550 mj/cm²’nin yanı sıra, kontrole göre hücre canlılığı % 32 olan 650 mj/cm² ve % 27 olan 750 mj/cm² dozları seçilmiştir.

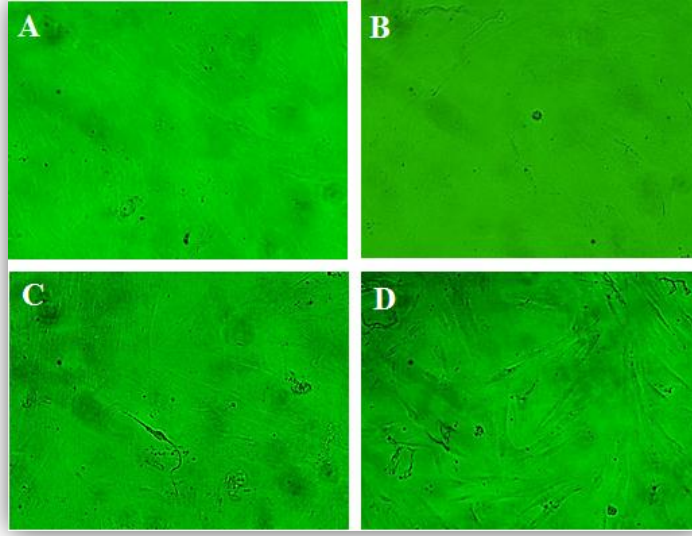


Şekil 3.28. UV-B'nin CRL-2120 canlılığı üzerine etkisi (* p<0,001)

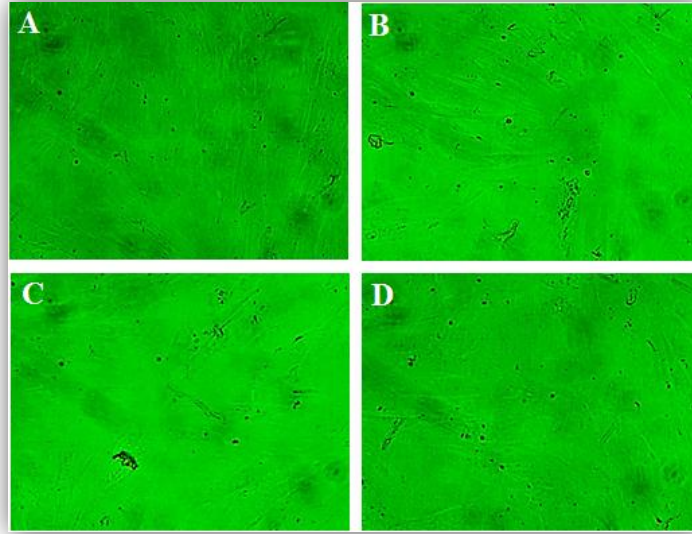
3.7.2. Uçucu yağların CRL-2120 hücrelerinin UV-B duyarlılığı üzerine etkileri

3.7.2.1 Kakao yağı

Kakao yağı ve UV-B dozlarının CRL-2120 hücreleri üzerinde kombine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, materyal ve yöntemde açıklandığı şekilde 96 kuyulu plakalarda büyütülen hücrelere DMSO ve çeşitli dilüsyonlarda kakao yağı uygulandıktan 24 sonra, 550, 650 ve 750 mj/cm² dozlarda UV-B uygulaması yapılmıştır. UV-B uygulamasının ardından tekrar kakao yağının aynı dilüsyonlarına maruz bırakılan hücreler, 24 saat sonra ters-faz mikroskopta fotoğraflanmış ve WST-1 reaktifi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. (Şekil 3.29, 30, 31, 32, 33).



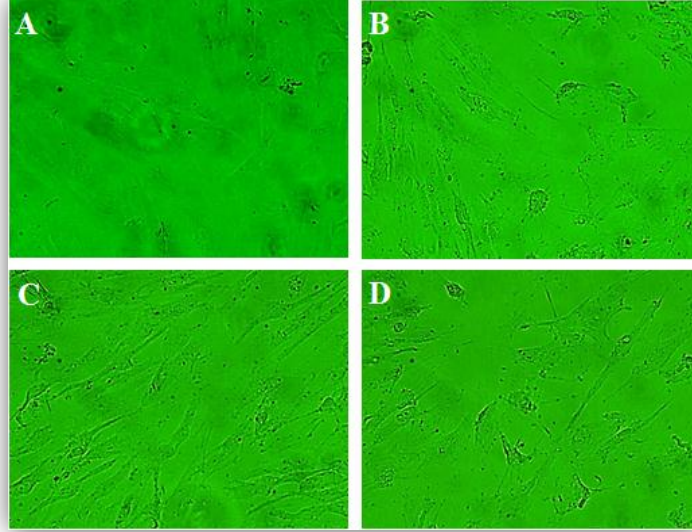
Şekil 3.29. UV-B^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mJ/cm² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 kontrol hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri, büyütme 400X



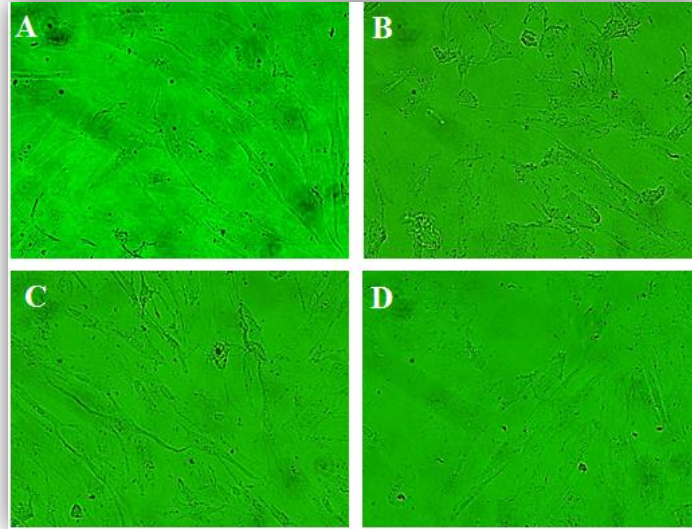
Şekil 3.30. DMSO + UV-B^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mJ/cm² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri, büyütme 400X

Negatif kontrol (UV-B^{negatif}) grubu ile kıyaslandığında, ters-faz mikroskop görüntülerine göre; 550, 650 ve 750 mJ/cm² UV-B dozlarına maruz kalan hücrelerin sayısında UVB dozuna bağlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 3.29). Diğer yandan; hücrelerde UV-B dozuna bağlı hücre büzülmesi ya da şişmesi, çekirdekte parçalanma, sitoplazmik ya da nüklear boğumlanma gibi herhangi bir

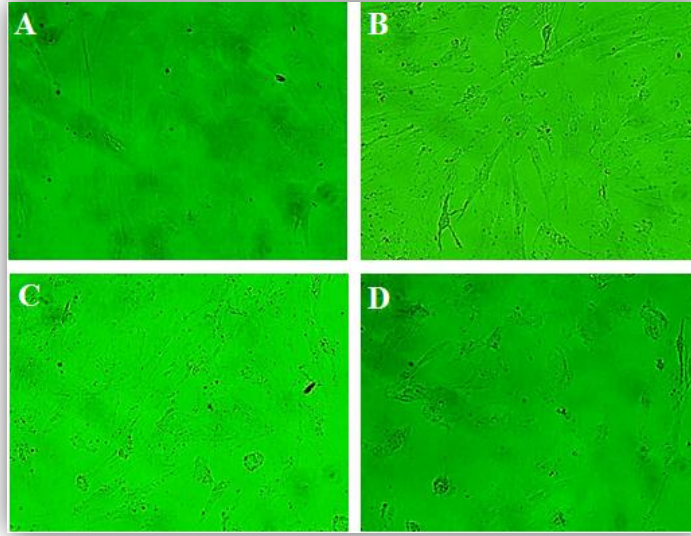
morfolojik değişim gözlenmemiştir. 1 µl/ml DMSO uygulanmış olan hücrelerde ise UV-B dozları da uygulanmış hücrelerin sayısında UV-B^{negatif} hücrelere göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 3.30). Çözücü uygulanan hücrelerinin de yine morfolojik açıdan UV-B'ye maruz bırakılmamış hücrelerle benzer yapıda oldukları gözlenmiştir.



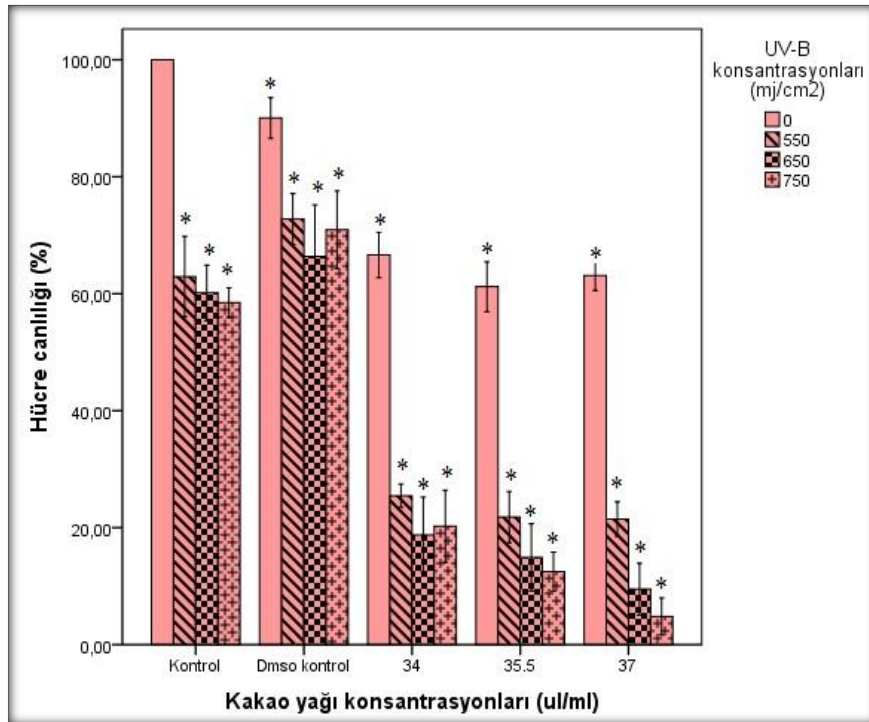
Şekil 3.31. 34 µl/ml kakao yağı + UV-B^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mJ/cm² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri, büyütme 400X



Şekil 3.32. 35.5 µl/ml kakao yağı + UV-B^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mJ/cm² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri, büyütme 400X



Şekil 3.33. 37 µl/ml kakao yağı + UV-B^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mJ/cm² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri, büyütme 400X



Şekil 3.34. UV-B ve kakao yağı dilüsyonlarının CRL-2120 canlılığı üzerine kombine etkisinin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi (* p<0,001)

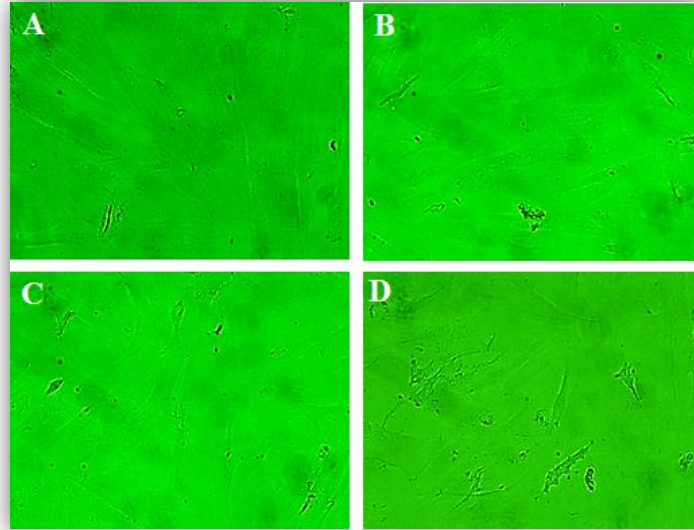
34, 35.5 ve 37 $\mu\text{l/ml}$ kakao yağı uygulanan CRL-2120 hücrelerinin sayısında UV-B^{negatif} hücelere göre UV-B dozuna bağlı belirgin bir azalma görülmektedir (Şekil 3.31, 32, 33). CRL-2120 hücrelerinin kakao yağı ve UV-B dozlarına birlikte maruziyeti sonrasında, hücrelerin sitoplazmalarında çekilme ve büzülme görülmüştür. Normal koşullarda iğ şeklinde fibroblast morfolojisi gösteren CRL-2120 hücrelerinin kombine etki ile birlikte yuvarlak ve yıldız şeklinde bir morfolojiye dönüştükleri gözlenmiştir. CRL-2120 hücrelerinde uygulanan kakao yağının her üç dilüsyonunun da hücre morolojisinde deformasyona sebep olduğu gözlenmiştir. Uçucu yağ ve DMSO uygulanmayan “kontrol grubu” hücrelerinde, UV-B maruziyetiyle, hücre canlılığı UV-B dozuna bağlı olarak ve kontrole göre yaklaşık % 35-40 oranında azalmıştır (Şekil 3.34, kontrol). 1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO uygulanan hücrelerde, toplamda yaklaşık % 20-25’lik bir azalma gözlenmiştir. Ancak, gözlenen bu azalışın UV-B dozlarına paralel olmadığı, 750 mJ/cm^2 UV-B uygulanan hücrelerdeki canlılığın 550 mJ/cm^2 ’deki canlılığa yakın oranda olduğu fakat 650 mJ/cm^2 ’den yaklaşık % 5 daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.34, DMSO kontrol). Sadece DMSO uygulanan hücrelerin canlılık oranının, hiçbir uygulama yapılmamış negatif kontrol hücrelerinden de UV-B ile DMSO kombine uygulanmış hücrelerden de daha yüksek olduğu dikkati çekmiştir ve bu sonuç, DMSO uygulamasının CRL-2120 hücrelerinde UV-B ışınlarına karşı direnci arttırdığını düşündürmüştür.

Kakao yağı ve UV-B uygulanmamış negatif kontrol hücreleri ile kıyaslandığında, 34, 35.5 ve 37 $\mu\text{l/ml}$ kakao yağı uygulanan hücrelerde canlılık yaklaşık % 60-70 oranında gözlenirken, hücelere 550, 650 ve 750 mJ/cm^2 UVB uygulandığında, canlılık değerlerinin, hem kakao yağının hem de UV-B’nin dozuna bağlı olarak, yaklaşık olarak % 5 ile 25 arasında olduğu gözlenmektedir. CRL-2120 hücrelerinin UV-B ışınlarına olan direnci kakao yağının kombine uygulanmasıyla birlikte, UV-B dozlarına bağlı olarak azalmıştır. 34 $\mu\text{l/ml}$ kakao yağı uygulanan hücrelerde canlılık yaklaşık % 66 iken, UV-B ile birlikte uygulandığında, 550 mJ/cm^2 ’de % 25, 650 ve 750 mJ/cm^2 ’de %20 oranında canlı hücre tespit edilmiştir. 35.5 $\mu\text{l/ml}$ kakao yağı uygulanan hücrelerde canlılık yaklaşık %70 iken, UV-B ile birlikte uygulandığında, 550 mJ/cm^2 ’de yaklaşık % 21, 650 ve 750 mJ/cm^2 ’de canlılık % 12 ile 14 tespit edilmiştir. 37 $\mu\text{l/ml}$ kakao

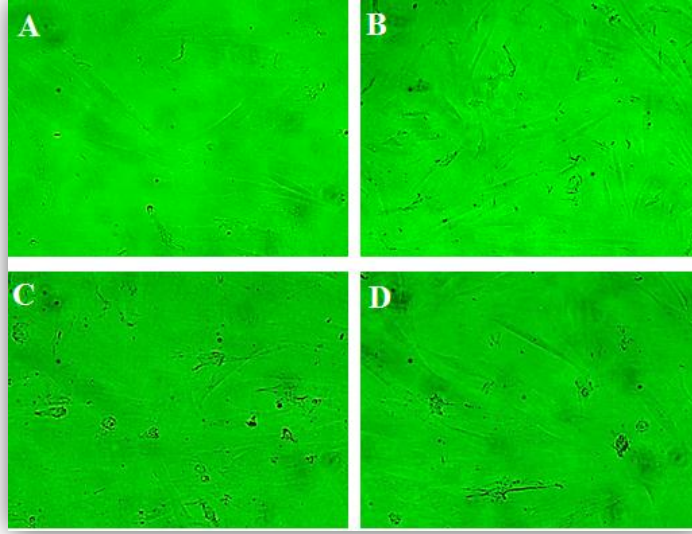
yağı uygulanan hücrelerde ise; 550, 650 ve 750 mJ/cm²'de sırasıyla % 20, 10 ve 5 oranlarına yakın değerlerde canlılık gözlenmiştir. Kakao yağı'nın tek başına canlılık oranı yaklaşık % 60-65 olarak gözlenmiştir (Şekil 3.34).

3.7.2.2 Kayısı yağı

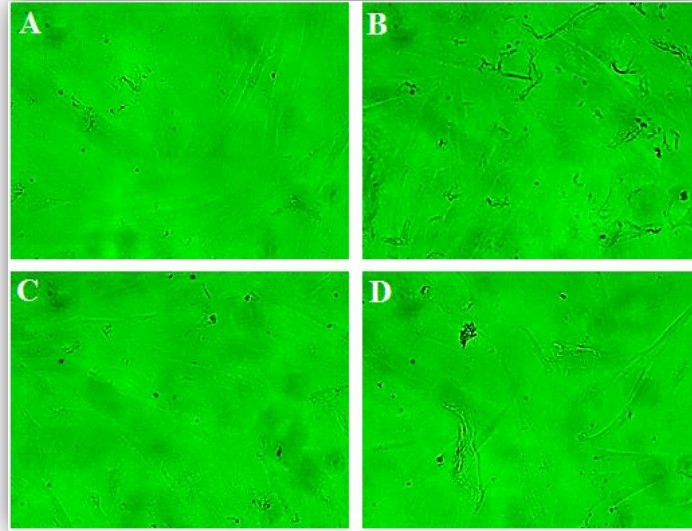
Kayısı yağı ve UV-B dozları CRL-2120 hücreleri üzerinde kombine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, 35.5, 37 ve 38.5 µl/ml kayısı yağı ve 550, 650 ve 750 mJ/cm² UV-B dozları tek başına ve kombine olarak uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler ters-faz mikroskopta fotoğraflanmış ve WST-1 reaktifi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. (Şekil 3.35,36, 37).



Şekil 3.35. 35.5 µl/ml kayısı yağı + UV-B^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mJ/cm² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri, büyütme 400X



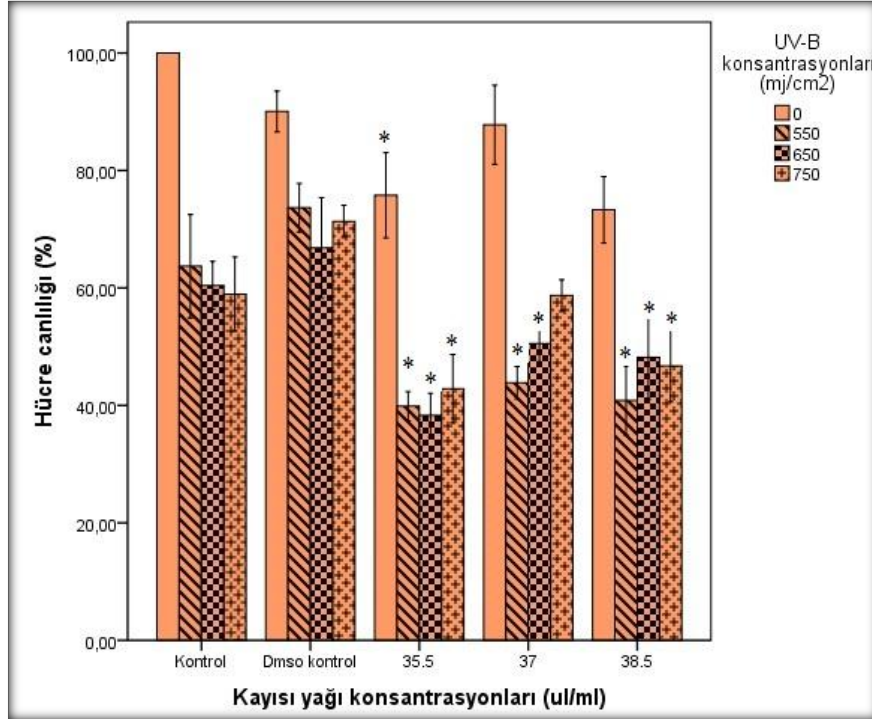
Şekil 3.36. 37 µl/ml kayısı yağı + UV-B^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mJ/cm² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri, büyütme 400X



Şekil 3.37. 38.5 µl/ml kayısı yağı + UV-B^{negatif} (A); 550 (B), 650 (C) ve 750 mJ/cm² (D) UV-B uygulanmış CRL-2120 hücrelerinin ters-faz mikroskop görüntüleri, büyütme 400X

Ters faz mikroskopi fotoğrafları incelendiğinde, kayısı yağının CRL-2120 hücrelerinin canlılığını, kontrol hücrelerine kıyasla ve UV-B dozlarına bağlı olarak azalttığı gözlenmiştir (Şekil 35, 36, 37). Kontrol grubundaki uzun ve mekik şeklinde, fibroblast morfolojisi gösteren hücrelerle kıyaslandığında, özellikle 750 mJ/cm² UV-B ve kayısı yağı ile muamele edilen hücrelerde yuvarlak morfoloji,

büzüşme ve sitoplazmik boğumlanma gibi morfolojik değişimler gözlenmiştir (Şekil 35-D, 36-D ve 37-D).



Şekil 3.38. UV-B ve kayısı yağı dilüsyonlarının CRL-2120 hücre canlılığı üzerine kombine etkisinin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi. (* $p < 0,001$)

Kayısı yağının ve UV-B ışınlarının CRL-2120 hücrelerinin çoğalması ya da canlılığı üzerine etkileri WST-1 testi ile araştırılmış ve sonuçlar Şekil 3.38’de verilmiştir. UV-B uygulanmaksızın hücreler sadece kayısı yağının 35.5, 37 ve 38.5 $\mu\text{l/ml}$ dilüsyonlarına maruz kaldıklarında, hücre canlılığı yaklaşık % 70-90 arasında ölçülmüştür. Ancak 550 mJ/cm^2 UV-B uygulandığında, 35.5 $\mu\text{l/ml}$ kayısı yağı uygulanmış hücrelerde canlılık yaklaşık % 40-45’e düşmüştür. 37 $\mu\text{l/ml}$ kayısı yağı dilüsyonunda ise UV-B dozuna bağlı olarak hücre canlılığında artış gözlenmiş, 750 mJ/cm^2 ’de canlılık yaklaşık % 60’a yükselmiştir. 38.5 $\mu\text{l/ml}$ kayısı yağı tek başına uygulandığında canlılık % 80’e yaklaşırken, UV-B ile kombine uygulandığında hücre canlılığı % 40-50 arasında gözlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Uçucu yağlar antiseptik, antimikrobiyal, analjezik anti-inflamatuvar özelliklere sahiptirler. Gıdalarda koruyucu olarak, sakinleştirici, spazm giderici ve lokal anestezi ilaçları olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadırlar. Uçucu yağların kolay elde edilebilir olmaları, tatlı aromaya sahip olmaları, düşük ya da önemsiz derecede toksisiteye sahip olmaları birçok kronik hastalıkların uzun süreli tedavisinde kullanımını çekici kılmaktadır. Bu nedenle çeşitli uçucu yağlar kaynaklı doğal ürünlerin taranması farklı kanserlerin tedavisinde yüksek umut vaat etmektedir (Kumar ve ark. 2008; Sharma ve ark. 2010).

Çalışmamızda deri kanseri (Malme-3M; malignant melanoma) ve sağlıklı deri fibroblast (CRL-2120) hücrelerinde kakao ve kayısı yağlarının sitotoksik etkileri belirlenmiş, melanom hücrelerinde uçucu yağların apoptotik etkileri araştırılmış, sağlıklı hücrelerde ise UV-B ışınlarının tek başına ve uçucu yağlar ile kombine etkisi belirlenmiştir.

4.1. Kakao Yağının Sitotoksik ve Apoptotik Etkisi

Kakao yağı uygulanan malignant melanom (Malme-3M) ve sağlıklı deri (CRL-2120) hücrelerinde WST-1, MTT ve NR alınımı yöntemlerine göre belirlenen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Kakao yağının CRL-2120 ve Malme-3M hücrelerindeki IC₅₀ değerleri (µl/ml)

µl/ml	24 SAAT			48 SAAT			72 SAAT		
	WST-1	MTT	NR	WST-1	MTT	NR	WST-1	MTT	NR
Malme-3M	>21.5	>24.5	>24.5	20	18	18	16.5	15	16.5
CRL-2120	>46	>43	44.5	38.5-40	40	40	<38.5	40	< 37

Deri kanseri hücrelerine, sağlıklı fibroblastlara kıyasla daha düşük dilüsyonlarda kakao yağı uygulanmıştır. Çizelge 4.1’de de görüldüğü gibi kakao yağının Malme-3M hücrelerinde, üç farklı yöntemle belirlenen IC₅₀ değerlerinin ve canlılık oranlarının birbirine yakın olmakla beraber farklılık gösterdiği dikkati çekmektedir. Bu farklılıkların üç yöntemin farklı mekanizmalara sahip

olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nötral kırmızısı alımı yöntemi, hasara uğramamış-canlı hücrelerin lizozomlarında nötral kırmızısı boyasının birikimi prensibine dayanmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2006). MTT yönteminde ise suda çözünmeyen sarı tetrazolyum tuzları metabolik olarak aktif halde bulunan hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat dehidrojenaz enzimi tarafından suda çözünmeyen mavi/mor formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Toksik hasar sonrasında ölen hücreler ise bu dönüşümü yapamamaktadır (Scherliess, 2011; Benassi ve ark. 2006). WST-1 yöntemi de MTT'de olduğu gibi canlı hücre sayısı ile orantı gösteren formazan oluşumuna dayanmaktadır. Ancak WST-1 yönteminde formazan suda çözünür yapıda olduğundan, çözücü ilavesine gerek duyulmamaktadır (Schröterová ve ark. 2009). MTT yönteminde boya için gerekli olan inkübasyon süresi tamamlandığında deney plakasından besi yeri uzaklaştırılarak formazan kristallerinin çözünmesi için çözücü ilavesi yapıldığından bu esnada formazan kaybı oluşabileceği ihtimal dâhilindedir. WST-1 yönteminde ise plakadan besi yeri uzaklaştırılmadığından canlı hücre kaybı ihtimali daha azdır.

Deri kanseri ve sağlıklı fibroblast hücrelerinin üç yöntem ile elde edilen canlılık oranları karşılaştırıldığında, deri kanseri hücrelerinin kakao yağına daha hassas oldukları belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saat inkübasyonda, kanserli hücrelerde belirlenen IC₅₀ değerlerinin sağlıklı hücrelerdekinin yaklaşık yarısı olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, deri kanseri hücrelerinin kakao yağına hassasiyetlerinin sağlıklı fibroblastlardan çok daha fazla olduğunu göstermiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, flavanoidler, flavon ve flavanollerin hücre döngüsü tutuklanması ve apoptozu tetikleyerek kanser hücrelerine özgü sitotoksik etki gösterdiği ortaya konmuştur (Zhang ve ark. 2008). Kakaoda bulunan başlıca flavanoidler kateşin, epikateşin ve ilgili prosiyanidin oligomerleridir (Steinberg ve ark. 2003). Kakao ekstraktlarındaki polifenoller ile yapılan çalışmada bileşenlerin prostat kanser hücrelerinde çoğalmayı engelleyici etki gösterdiği sağlıklı prostat hücrelerinde ise etkili olmadığı belirtilmiştir (Jourdain ve ark. 2006). Kateşin ve türevleri ile Tan ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise insan kolon kanseri hücrelerinde epigallokateşin-3-gallat ve epigallokateşinin doza bağlı olarak hücre çoğalmasını engellediği

belirtilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde gözlenen DNA kırıkları ile epigallokateşin-3-gallat ve epikateşin-3-gallat ve epigallokateşinin apoptozu uyardığı, aynı zamanda hücre döngüsünü G₁ evresinde durdurduğu, epikateşinin ise S evresinde tutuklanmaya neden olduğu bildirilmiştir (Tan ve ark. 2000). Avelar ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise piroisiyanidin B2'nin doza ve zamana bağlı olarak, karaciğer kanseri hücrelerinin canlılığında azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir (Avelar ve ark. 2012). Kozmetik sektöründe geniş ölçüde kullanıma sahip olan lavanta yağının insan deri hücrelerinde (endotelyal ve fibroblast) özellikle % 0.25 dozundan itibaren hücre canlılığında azalışa neden olduğu yine bir diğer çalışmada tespit edilmiştir.

Literatürde kakao yağı ekstraktları ya da içerdiği flavanoidlerin saf olarak kullanıldığı çalışmalarında, bizim çalıştığımızdan çok daha düşük dilüsyonlarda sitotoksitenin görüldüğü dikkat çekmektedir. Çalışmamızda kullanılan uçucu yağların kozmetik ve gıda sektörlerinde kullanıldığından, saf olmaması, içerisinde farklı bileşenleri de bulundurması, canlılığı inhibe edici etkinin daha yüksek dilüsyonlarda olmasına sebep olmaktadır. Kakao yağının deri hücrelerindeki sitotoksitesi hakkında yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Kozmetik ve gıda sektörlerinde satılan kayısı yağının kullanıldığı çalışmamız bu anlamda özgün değer taşımaktadır.

Kakao yağının Malme-3M hücrelerinde apoptotik etkisi

Çalışmada; insan deri kanseri hücrelerinde kakao yağının apoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hücrelerin morfolojik değişimleri floresan mikroskopta incelenmiş ve aktif kaspaz-2 enzim seviyesi ölçülmüştür. Kanserli hücrelerin çoğalma hızında uçucu yağların etkisinin belirlenmesi amacıyla, hücre döngüsü ve DNA içerik analiz yapılmıştır. Diğer yandan, hücre döngüsünü kontrol eden transkripsiyon faktörlerden olan p53 proteinin miktarı ve hücre içindeki translokasyonu belirlenmiştir.

Kakao yağının insan deri kanserinde hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırılmış ve G₁ evresinde tutuklanan hücrelerin oranında, inkübasyon süresine bağlı olarak, özellikle 48. saatte ve 20 µl/ml'de belirgin bir artış görülmüştür (Çizelge 4.2). Bunun yanı sıra, S evresindeki hücrelerin oranında yine 48. saatte anlamlı bir azalma da dikkati çekmiştir.

Çizelge 4.2. Kakao yağının insan deri kanserinde G₁, S ve G₂ evrelerindeki tutuklanmaya etkisi

Test maddesi (µl/ml)		24 saat			48 saat		
		% G1	% G2	% S	% G1	% G2	% S
DMSO	1	57.04	5.77	37.19	65.31	3.67	31.02
KAKAO YAĞI	18	71.41	4.04	24.55	90.42	1.14	8.44
	20	69.28	5.42	25.3	96.22	0.35	3.43

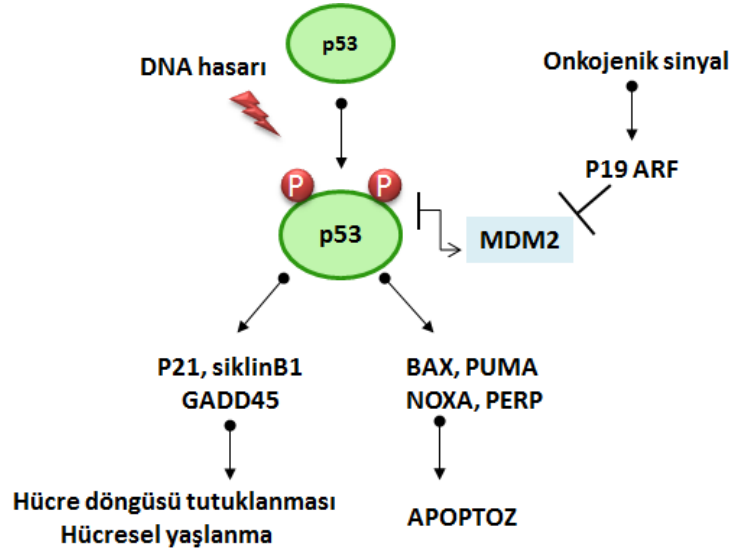
Hücrelerin p53 protein seviyeleri incelendiğinde; 18 µl/ml kakao yağına maruz kalan hücrelerde, 12. saatte, sitoplazmadaki p53 miktarı kontrole oranla yaklaşık % 50 azalmıştır (Çizelge 4.3). Ancak çekirdekteki miktarında yaklaşık % 25 oranında artış dikkati çekmektedir. Bu sonuç, p53'ün 18 µl/ml kakao yağı etkisiyle (hücre döngüsünü durdurma amacıyla) sitoplazmadan çekirdeğe transloke olmaya başladığını göstermektedir. 24. saate gelindiğinde; 12. saate kıyasla sitoplazmadaki p53 miktarında zayıf da olsa bir artış olduğu görülmüştür. Ancak yine de sitoplazmadaki p53 miktarı kontrole kıyasla % 40 oranında daha düşüktür. 24 saatte perinüklear alandaki p53 miktarı hem kontrole hem de 12 saate oranla yükselmiştir. Yani p53'ün sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonu artarak devam etmektedir. 20 ve 21.5 µl/ml'de sitoplazma ve perinüklear alandaki p53 miktarı giderek azalmasına karşın çekirdekteki miktarının özellikle 12.saatte az da olsa artış gösterdiği dikkat çekmektedir. 21.5 µl/ml kakao yağı uygulaması sonucunda p53 proteininin çekirdek içine translokasyonunun artış gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.3. Kakao yağı uygulanmış deri kanseri hücrelerinde p53 seviyesi ve yerleşimi (Ç: çekirdek, P: perinüklear, S: sitoplazma)

Test bileşeni (µl/ml)		12 saat (%)			24 saat (%)		
		Ç	PN	S	Ç	PN	S
DMSO	1	4,18	1,07	1,32	3,62	1,14	1,34
KAKAO YAĞI	18	6,00	1,08	0,63	3,97	1,52	0,93
	20	6,03	0,48	0,1	4,95	0,11	4,67
	21,5	8,53	0,86	0,36	4,64	0,48	1,34

P53 proteininin hücre döngüsü düzenlenmesi ve apoptoz arasında önemli bir bağlantı görevi gördüğü bilinmektedir (Huang ve ark. 2011). Hücre

döngüsünün baskılanması, DNA hasarını içeren çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak meydana gelmektedir (Lam ve ark. 2012) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. p53 proteininin transkripsiyonal aktivitesi (Fuster ve ark. 2007)

DNA hasarı varlığında ATM/ATR tarafından serin fosforilasyonu ile p53 aktive edilmekte ve kararlı hale getirilmektedir. Bu da p53'ün çekirdekte yerleşim göstermesine, hücre döngüsü ve apoptozu düzenleyecek olan p21 ve Bax gibi transkripsiyonal hedeflerin aktivasyonuna neden olmaktadır (Lam ve ark. 2012). Bu çalışmada, kakao yağının etkisiyle, deri kanseri hücrelerindeki p53'ün 12. saatte çekirdekte yerleşim göstermesi, hücre döngüsünü ve apoptozu düzenleyecek olan *p21* ve *Bax* genleri için “transkripsiyon faktörü” görevini yapmaya başladığını göstermiştir. Dolayısıyla, bu bulgu 48. saatte hücrelerin G₁ de tutuklanması ve S fazına geçememesini de açıklamaktadır.

p53 fonksiyonunun anahtar düzenleyicisi Mdm2 proteini, p53'ün transaktivasyon bölgesine bağlanıp transkripsiyonal aktivitesini engelleyerek p53'ün yıkımını ve çekirdekten taşınmasını düzenlediği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. (Fuster ve ark. 2007). p53 ve Mdm2 proteinleri arasındaki etkileşimin p53'ün Mdm2'ye bağlandığı bölgenin bazı kinazlar aracılığıyla fosforillenmesiyle bozulabildiği ve doğrudan p53'e ya da Mdm2'ye bağlanabilen çeşitli proteinlerle p53-Mdm2 etkileşiminin engellenebileceği rapor edilmiştir (Vousden ve Prives 2009, Brooks ve Gu 2003). Ayrıca, p53'ün Mdm2-

bağımlı yıkımında p14^{ARF} (ya da ARF) da önemli bir düzenleyici olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Chumakov 2007) (Şekil 4.1).

Kakao yağının hücre morfolojisi üzerine etkileri incelendiğinde; 48 saatte deri kanseri hücrelerinde kontrole göre sayıca azalma, yuvarlak bir şekil kazanarak hücreler arası matriksten kalkması ve aynı zamanda hücreler arasındaki adezyonun kaybolması gibi apoptoza işaret eden morfolojik hasarlara neden olduğu belirlenmiştir. Deri kanseri hücrelerinde kakao yağı ile uyarılan apoptotik morfolojik değişimlerin % 20-27'lik bir oranda olduğu Çizelge 4.4'de görülmektedir.

Çizelge 4.4. Kakao yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde 48 saat inkübasyonda belirlenen canlı, apoptotik ve ölü (nekrotik) hücre yüzdeleri

Test Maddesi (µl/ml)		Canlı (%)	Apoptotik (%)	Ölü/Nekrotik (%)
DMSO	1	91,67	7,37	0,96
KAKAO YAĞI	18	72,59	26,06	1,35
	20	79,43	19,63	0,94
	21.5	72,98	26,34	0,68

Gözlenen etkilerin, kakao yağının etkin flavanoid bileşenlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu konuda yapılmış bir çalışmada, Ramljak ve arkadaşları, kakaodan türevlenen pentamerik prosiyanidin bileşenlerinin insan akciğer ve meme kanser hücreleriyle sağlıklı insan epitelyal hücrelerini G₁ evresinde tutuklayarak hücre çoğalmasını engellediğini göstermişlerdir. Söz konusu etkinin akciğer kanseri hücrelerinde Cdc2 ve p53 gibi hücre döngüsü düzenleyicisi rolü olan bazı proteinlerin defosforilasyonu ve down regülasyonu ile gerçekleştiği de aynı çalışmada bildirilmiştir. Carne'secchi ve arkadaşları tarafından insan kolon kanseri hücreleri (Caco-2) ile yapılan bir çalışmada ise kakao tozu, işlenmemiş prosiyanidin ve prosiyanidince zengin kakao ekstraktlarının antikanser ve apoptotik etkileri ortaya konulmuştur. Kakaonun prosiyandinin örneklerinin doza bağlı olarak 10 gün inkübasyon süresinde hücre çoğalmasını inhibe edici etkisi ortaya konmuş, hücre ölümünün nekroz yoluyla gerçekleştiği, hücre çoğalmasını engelleyici etkinin hücre döngüsünün G₂/M evresinin durdurulması ile sağlandığı belirtilmiştir. (Carnésecchi ve ark. 2002).

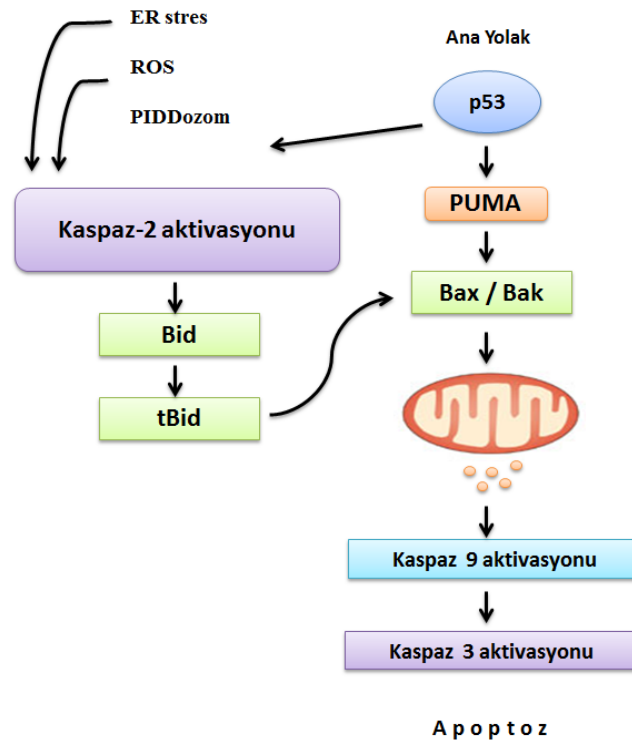
Yamauchi ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada, akciğer kanseri hücrelerinde epigallokateşin-3-gallatın (EGCg) hücre canlılığını azalttığı, kaspaz 3/7 enzimlerini indükleyerek apoptozu uyardığı ortaya konmuştur. Ayrıca EGCg'nin 24 saatte p53 protein miktarını ve serin fosforilasyon seviyesini arttırdığı ve p53'ün EGCg indüklü apoptozda görev aldığı bilgisini ortaya koymuştur (Yamauchi ve ark. 2009). Shang ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, 6 ve 24 saat boyunca 100-300 mg/ml procyanidin uygulanmış PC-3 (prostat kanseri) hücreler, Anneksin-5 ve Propidyum iyodidle floresan olarak boyanmış ve doza ve zamana bağlı olarak apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir (Shang ve ark. 2009). Mide kanseri hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise yeşil çaydan elde edilen epigallokateşin gallatın canlılığı doza bağlı olarak azalttığı, kaspaz 3/8/9 enzim seviyelerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, epigallokateşin gallatın hücrelere epikateşin ile birlikte uygulanması halinde oluşan sinerjik etkinin apoptozu uyardığı da gözlenmiştir (Horie ve ark. 2005).

Deri kanseri hücrelerinde, kakao yağının uyardığı aktif kaspaz-2 enzim seviyesi (Çizelge 4.5), uygulanan her iki dilüsyonda da sadece 48. saatte artmıştır. DNA hasarına ya da diğer hücresel stres sinyallere cevaben p53 proteininin PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), bax ya da bak proteinlerinin aktivasyonu yoluyla hücre ölümünü uyardığı Kumar ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Bu proteinlerin aktivasyonu, mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP) ile başlayan ve kaspaz şelalesinin aktivasyonuna kadar gelişen olayların tetiklendiği ve alternatif bir yolak olarak da kaspaz-2, MOMP'tan önce aktive edildiği de yine aynı araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Kumar 2009).

Çizelge 4.5. Kakao yağının Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesine etkisi, inaktif (Q3) ve aktif kaspaz-2 (Q4)

Test bileşeni (µl/ml)		12 saat (%)		24 SAAT (%)		48 SAAT (%)	
		Q3	Q4	Q3	Q4	Q3	Q4
DMSO	1	98	1.6	94.3	4.7	92.5	6.4
KAKAO YAĞI	20	97.4	2.1	94.4	3.9	88	9.6
	21,5	97	2.3	94.8	2.7	85.8	11.1

Kaspaz-2 enzimi, PIDDozom adı verilen büyük bir protein kompleksinin oluşumu sonucunda oligomerize olarak aktifleşmektedir. Bu kompleks; PIDD (p53 uyarımlı ölüm bölgesi içeren protein)'in RAIDD ve öncü kaspaz-2'ye bağlanmasıyla oluşmaktadır. PIDD dozundaki artışın, kaspaz-2 aktivasyonunu arttırdığı, ancak düşük stres şartlarında PIDD dozunda azalış olduğu, PIDD seviyesindeki bu azalmanın p53 uyarımlı apoptozun da azalmasına neden olduğu bazı çalışmalarla tespit edilmiştir (Baptiste-okoh 2008; Zhivotovsky 2005). Aktive olup kesilen kaspaz-2'nin, bid'i aktive ederek MOMP aracılı sitokrom c salınımı gerçekleştirdiği, aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve endoplazmik retikulum stresinin uyardığı apoptoza da aracılık ettiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir (Kumar 2009).



Şekil 4.2. Kaspaz-2 aracılı ve kaspaz-2 bağımsız apoptotik yollar (Kumar 2009)

Vakifahmetoğlu ve arkadaşlarının kalın bağırsak kanseri hücreleri ile yapmış olduğu bir çalışmada, 5FU'nun kaspaz-2 ve kaspaz-3 aktivitesini 2-10 saat aralıklarında zamana bağlı olarak arttırdığı ve kaspaz-2'nin kaspaz-3'ten önce aktive olduğu belirtilmektedir. Yabani tip p53 proteinine sahip (p53^{+/+}) hücrelerde

4 ve 8.saatte kaspaz-2 seviyesi artış gösterirken p53'ten yoksun (p53^{-/-}) hücrelerde düşük seviyede bir artış görülmüş ya da hiç artış görülmemiştir. Aynı zamanda çalışmada PIDD ve RAIDD proteinlerinin 5FU ile muamele edilmeyen hücrelerde de kaspaz-2 ile birlikte lokalize olması bu proteinlerin kaspaz-2 aktivasyonundaki tek araçlar olmadığını da bildirilmiştir (Vakifahmetoglu ve ark.2006).

Çalışmamızda p53 proteinin 12. saatte çekirdekte transloke olması, G₁ de tutuklanan ve S evresine geçemeyen hücrelerin sayısı ile aktif kaspaz-2 enzim seviyesinin ve apoptotik morfolojik değişimin 48. saatte artış göstermesinin birbirini destekleyen sonuçlar olduğu düşünülmektedir. Kaspaz-2 enzim seviyesinin 24 ve 48 saatleri arasında daha yüksek olma ihtimali de bulunmaktadır. Bu süreçte, kaspaz-2 enziminin PIDD ve RAIDD proteinleri aracılığıyla bid proteininin aktivasyona arttırabileceği ve apoptotik süreci başlatabileceği düşünülmektedir. Bu durumun aydınlatılabilmesi için, kakao yağıyla daha kısa inkübasyon sürelerinde de aktif kaspaz-2 enzim miktarının ölçülmesi gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca bu mekanizmanın daha iyi aydınlatılabilmesi için kaspaz-3/9, bid, bax gibi apoptotik yolda görev alan molekül, enzim ve proteinlerin, miktar tayini, aktivite ölçümü ve gen anlatımı seviyelerinde belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

4.2. Kayısı Yağının Sitotoksik ve Apoptotik Etkisi

Kakao yağında olduğu gibi kayısı yağında da üç yöntem ile belirlenen canlılık oranlarına bakıldığında (Çizelge 4.6), sağlıklı hücrelerin kayısı yağına karşı daha dirençli oldukları söylenebilmektedir.

Çizelge 4.6. Kayısı yağının CRL-2120 ve Malme-3M hücrelerindeki IC₅₀ değerleri (µl/ml)

	24 SAAT			48 SAAT			72 SAAT		
	WST-1	MTT	NR	WST-1	MTT	NR	WST-1	MTT	NR
Malme-3M	>32	29	24.5-26	26	27.5	26	27.5	<24.5	23
CRL-2120	40-41.5	46	43	40	38.5	40	<38.5	41.5-43	35.5

Kayısı meyvesi yağ, protein, lif, çözünebilir şeker, yağ asitleri; beta karoten, beta kriptoksantin, gama koroten ve likon gibi karetenoidler ve kateşin, epikateşin gibi fenolik bileşenler ve bazı mineraller açısından zengin bir kaynaktır (Erdoğan ve ark.2011). Kayısının bütanol ekstraktının bazı gram-pozitif ve negatif bakteriler üzerinde antibakteriyal aktivitesi araştırılmış, özellikle gram pozitif bakterilerde büyümeyi engelleyici etkisi ortaya konmuştur (Erdoğan ve ark. 2011). Bir başka çalışmada ise acı kayısının metanol ekstraktlarının Gram negatif bakteri (*Escherichia coli*) üzerinde oldukça aktif olduğu gösterilmiştir (Yiğit ve ark. 2009).

İnsan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) ile yapılan bir çalışmada kozmetik sektöründe kullanıldığı bilinen bergamut yağının sitotoksik etkisi araştırılmış, 24 saatte % 0,02 ve 0,03 dozlarda hücre çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir (Berliocchi ve ark. 2011). Ana bileşenlerinden birisi timol terpenoidi olan *Ocimum viride* bitkisi uçucu yağı insan kolon kanseri hücrelerinde 0.0125-0.1 µl/ml dilüsyon aralığında 24, 48 ve 72 saat uygulanmış, hücre çoğalmasını doza ve zaman bağlı olarak inhibe ettiği gözlenmiştir (Sharma ve ark.2010). Tavares ve arkadaşları, bronzlaştırıcı olarak yaygın kullanıma sahip olan havuç yağının antifungal ve sitotoksik etkilerini fare dendiritik deri hücrelerinde araştırmışlardır. Farklı bölgelerden elde edilen 2 havuç yağı örneklerinden biri antifungal etki gösterirken, diğeri 1.25 µl/ml dilüsyonda deri hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Tavares ve ark.2008).

Çalışmamızda halk arasında bronzlaştırıcı olarak tercih edilen, kozmetik ve gıda sektörlerinde kullanılan kayısı yağı kullanılmıştır. Literatürde kayısı yağı ile deri hücrelerinde yapılan bir sitotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Kayısının fenolik bileşenleri ya da bitki ekstraktlarından elde edilen diğ er uçucu yağlar ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında çalışmamızda uygulanan dozların daha yüksek oranlarda olduğu görülmektedir. Bu durumu daha önce de belirtildiği gibi kayısı yağının saf halde olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kayısı yağının Malme-3M hücrelerinde apoptotik etkisi

Çalışmada; İnsan deri kanseri (melanom) hücrelerinde kayısı yağının apoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hücrelerin morfolojik değişimleri

floresan mikroskopta incelenmiş ve aktif kaspaz-2 seviyesi ölçülmüştür. Kanserli hücrelerin çoğalmasında uçucu yağların etkisinin belirlenmesi amacıyla, hücre döngüsü ve DNA içerik analiz yapılmıştır. Diğer yandan, hücre döngüsünü kontrol eden transkripsiyon faktörlerden olan p53 proteinin miktarı ve hücre içindeki translokasyonu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, kayısı yağının insan deri kanseri (melanom)'nde hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırılmış, 24 ve 48 saatte G₁ evresinde kontrole oranla hücre tutuklanmasında zamana bağlı olarak artış olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.7). 24 saatte S evresinde % 15-20 oranında azalış görülürken 48 saatte kontrole oranla S evresinde tutulan hücre sayısında oldukça belirgin bir artış dikkat çekmektedir.

Çizelge 4.7. Kayısı yağının insan deri kanserinde G₁, S ve G₂ evrelerindeki tutuklanmaya etkisi

Test maddesi (µl/ml)		24 saat			48 saat		
		% G1	%G2	% S	% G1	%G2	% S
DMSO	1	57.04	5.77	37.19	65.31	3.67	31.02
KAYISI YAĞI	24.5	78.83	3.19	17.98	89.12	3.95	6.93
	26	75.33	4.39	20.28	95.93	0	4.07

P53 protein seviyesinde, 12 saatte 24.5 µl/ml kayısı yağı dilüsyonunda kontrole kıyasla çekirdekte transloke olan protein miktarında % 50 oranında artış, sitoplazmadaki proteinde de kontrole oranla 4 kat artış görülmektedir (Çizelge 4.8). 12 saatte 26 µl/ml'de ise sitoplazmadaki protein miktarının kontrole kıyasla 4 kat artması ve çekirdekteki protein miktarının kontrole oranla düşük seviyede artış göstermesi proteinin çekirdekten sitoplazmaya taşındığını göstermektedir. 24.5 ve 26 µl/ml dilüsyonda sitoplazmaya taşınan protein miktarının 12 saatten önce ya da 12 ile 24 arasında çekirdekte yerleşim göstermiş durumda olabileceği düşünülmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi p53'ün çekirdekte yerleşim göstermesi, hücre döngüsünü ve apoptozu düzenleyecek p21 ve Bax gibi transkripsiyonal hedeflerin aktivasyonuna neden olmaktadır (Lam ve ark. 2012). Özellikle 48.saatte 24.5 ve 26 µl/ml kayısı yağında, G₁ evresinde tutuklanan hücrelerin artışı ve S evresindeki belirgin azalışın p53 proteinin 24 saatte bir kısmı sitoplazmada bulunan proteinin 12 ile 24 saat arasında çekirdekte lokalize olmuş

ve döngünün tutuklanmasına kadar transkripsiyonal aktivitesini göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.8. Kayısı yağı uygulanmış deri kanseri hücrelerinde p53 seviyesi ve yerleşimi (Ç: çekirdek, P: perinükleer, S: sitoplazma)

Test bileşeni (µl/ml)		12 saat (%)			24 saat (%)		
		Ç	PN	S	Ç	PN	S
DMSO	1	4,18	1,07	1,32	3,62	1,14	1,34
KAYISI YAĞI	23	4,97	0,48	1,59	3,83	1,14	2,28
	24,5	8,40	1,65	5,43	8,07	0,99	1,65
	26	5,25	1,28	5,25	6,47	1,49	6,47

AO/EB çift boyama ile melonom hücrelerinde kayısı yağı ile uyarılan apoptotik hücre oranı belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Hücrelerin apoptotik morfolojileri incelendiğinde, kayısının kontrole oranla yaklaşık % 22-27’lik bir apoptotik etki sergilediği görülmüştür.

Çizelge 4.9. Kayısı yağı ile muamele edilen Malme-3M hücrelerinde 48 saat inkübasyonda belirlenen canlı, apoptotik ve ölü (nekrotik) hücre yüzdeleri

Test Maddesi (µl/ml)		Canlı (%)	Apoptotik (%)	Ölü/Nekrotik (%)
DMSO	1	91,67	7,37	0,96
KAYISI YAĞI	23	77,22	22,13	0,65
	24,5	76,68	22,72	0,59
	26	71,22	27,85	0,93

Ocimum viride bitkisi uçucu yağı ile insan kolon kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada 0,05 ve 0,1 µl/ml dozları ile muamele edilen kolon kanseri hücrelerinde 24 saatte Go evresinde bulunan hücre sayısında artışa neden olduğu ayrıca yağ dozlarının apoptozu uyarıcı etkisi olduğu ortaya konmuştur (Sharma ve ark. 2010). Palozza ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada beta karotenin hücrelerde 10 µM dozda G₀/G₁ evresinde, 20 µM’da ise G₂/M evresinde tutuklanmasına neden olduğu gözlenmiştir. Beta karoten, bcl-2 protein miktarını azaltmış, p53 proteininden bağımsız olarak apoptozu uyardığı belirlenmiştir (Palozza ve ark. 2002). Kayısı ekstraktlarından elde edilen bir etken madde olan amigdalın ile kolon kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, amigdalinin hücre döngüsünde görev alan bazı genleri downregüle ettiği ve mRNA seviyelerinde

azalışa neden olduğu belirlenmiştir (Park ve ark. 2005). T lenfosit hücreleri ile (Jurkat E6.1 malignant) yapılan bir çalışmada 24 saat inkübasyonda beta karoten, likopen, lutein, beta kriptoksantin apoptotik etkisi araştırılmıştır. Beta karotenin zamana ve doza bağlı olarak apoptozu indüklediği belirlenmiş, Beta karotenle apoptozun indüklenmesi kromatin kondensasyonu, çekirdek fragmentasyonu, DNA degradasyonu, PARP parçalanması ve kaspaz-3 aktivasyonu ile karakterize olduğu saptanmıştır (Müller ve ark. 2002). Bir diğer çalışmada beta karotenin akciğer kanseri (MCF-7) hücresinde mitokondrial fonksiyon bozukluğu ve sitokrom c salınımı aracılığıyla hücreyi apoptoza götürdüğü belirlenmiştir (Chua ve ark. 2007). İnsan kan kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada beta karotenin 72 saatte beta karotenin apoptozu uyardığı ve bax ekspresyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir (Sacha ve ark. 2005).

Çalışmamızda kaspaz-2 seviyesinin 24 ve 48 saatte kayısı yağı dilüsyonlarında kontrole kıyasla azalış gösterdiği görülmektedir. 12 saatte ise enzim seviyesi 23 ve 26 µl/ml dilüsyonda 4-5 kat oranda, 24.5 µl/ml’de ise 3 katı oranda artış gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Kayısı yağının Malme-3M hücrelerinde aktif kaspaz-2 enzim seviyesine etkisi, inaktif (Q3) ve aktif kaspaz-2 (Q4)

Test bileşeni (µl/ml)		12 saat (%)		24 SAAT (%)		48 SAAT (%)	
		Q3	Q4	Q3	Q4	Q3	Q4
DMSO	1	98	1.6	94.3	4.7	94.9	4.0
KAYISI YAĞI	23	92.3	7.2	95.5	4.1	97.9	0.9
	24,5	94.9	4.7	97	2.3	97.1	1.0
	26	92.4	7.3	98.3	1.3	97.6	1.3

Kayısı yağı ile muamele edilen hücrelerde P53 protein seviyesinin 12 ve 24 saatte sitoplazmada lokalize olması kayısı yağında kaspaz-2 aktivasyonun daha erken sürede olabileceğini düşündürmektedir. Daha öncede belirtildiği gibi p53 indüklü ölüm bölgesi içeren proteinin (PIDD), kaspaz-2 ile kompleks oluşturması ile kaspaz-2’nin aktive edilmesi ve sitokrom c salınımı ile apoptozun gerçekleşmesi sağlanabilir (Baptiste-okoh, 2008; Zhivotovsky 2005; Kumar 2009). Bu durumda 48 saatte apoptoz uyarımının artışının kaspaz-2 aracılığı ile gerçekleştiği düşünülebilir.

4.3. UV-B ışınlarının CRL-2120 hücrelerinde tek başına ve uçucu yağlar ile kombine sitotoksik etkisi

İnsan derisi ve özellikle epidermis diğer organlardan farklı olarak doğrudan ve sürekli olarak çeşitli kimyasal ve fiziksel stres faktörlerine maruz kalmaktadır. Bu faktörler arasında UV ışınması yaygın bulunan çevresel faktörlerdendir. UV ışınmasına maruziyet, özellikle UV-B, eritema, hiperpigmentasyon, hiperplazi, immün baskılanma, foto-yaşlanma ve deri kanseri olmak üzere birçok etkiye sebep olmaktadır (Afaq ve ark .2007). Deri hücrelerinin UV-B'ye maruz bırakılması çeşitli tiplerde DNA hasarları, tümör oluşumunda gerekli olan genlerin düzenlenmesi ve birçok sinyal iletim yollarının aktive edilmesi ile sonuçlanmaktadır (Ji ve ark. 2012; Afaq ve ark . 2007).

Bu çalışmada UV-B maruziyetinin CRL-2120 hücrelerinde sitotoksik etkisi tripan-mavisi ile boyama yapılarak belirlenmiş, kakao ve kayısı yağlarının UV-B ile kombine etkisi WST-1 yöntemi ile araştırılmıştır.

UV-B ile kombine etkinin belirlenmesi için CRL-2120 hücrelerinin UV-B ışınlarına karşı hassasiyetinin bilinmesi gereklidir. Literatürde CRL-2120 (sağlıklı deri fibroblast) hücreleri üzerinde UV-B'nin etkisine dair bilgiye rastlanmamıştır. Ji ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada insan keratinosit ve sağlıklı deri fibroblast hücreleri üzerinde 15 ve 20 mj/cm^2 dozlarının canlılığı inhibe edici etki gösterdiği belirlenmiştir (Ji ve ark. 2012). Çalışmamızda ise ön araştırma olarak CRL-2120 hücrelerine 15 ve 30 mj/cm^2 UV-B dozları uygulanmış ancak canlılığı inhibe edici etki gözlenmemiştir. Daha sonraki çalışmalarda geniş aralıklarla 900 mj/cm^2 dozuna kadar UV-B uygulanmış, son olarak 550-800 mj/cm^2 UV-B dozları aralığında tripan mavisi ile boyama yapılarak UV-B'nin CRL-2120 hücreleri canlılığına etkisi değerlendirilmiştir. CRL-2120 hücrelerinde UV-B dozu için IC_{50} değeri 550 mj/cm^2 olarak bulunmuş, hücre canlılığının doza bağlı olarak azalış gösterdiği belirlenmiştir. CRL-2120 hücrelerinde, WST-1 yöntemi ile kombine etkinin araştırılması için 550, 650 ve 750 mj/cm^2 UV-B dozları seçilmiştir. CRL-2120 hücrelerinde kakao yağının 34, 35.5 ve 37 $\mu\text{l/ml}$ dilüsyonları, kayısı yağının ise 35.5, 37 ve 38.5 $\mu\text{l/ml}$ dilüsyonları uygulanmış ve 24 saat sonra UV-B muamelesi yapılmış, tekrar yağ dilüsyonları ile 24 saat muamelenin ardından WST-1 yöntemi ile canlılık oranları ölçülmüştür.

Çizelge 4.11. Kakao yağı dilüsyonları ve UV-B dozları kombinasyonunun CRL-2120 hücrelerinde canlılık üzerine etkisi

CRL-2120 Kakao yağı	Hücre canlılığı (%)				
UVB (mJ/cm²)	KONTROL	DMSO (1µl/ml)	Kakao yağı (µl/ml)		
			34	35.5	37
0	100	90.05	66.64	61.21	63.11
550	62.9	72.76	25.45	21.80	21.48
650	60.15	66.38	18.77	14.92	9.49
750	58.49	70.94	20.24	12.48	4.82

Çizelge 4.11 incelendiğinde WST-1 yönteminde kontrol grubunda yüksek ve düşük UV-B dozlarında % 38-42 oranlarında hücre canlılığında azalışa neden olduğu görülmektedir. Tripan mavisi boyama sonucunda elde edilen canlılık oranlarının farklı olduğu dikkat çekmektedir. Petride yapılan UV-B hassasiyet çalışmasında 550, 650 ve 750 mJ/cm² UV-B dozlarında canlılık oranları sırasıyla % 47, 32 ve 22 olarak belirlenmiştir. 96 kuyulu plakada yapılan WST-1 yönteminde ise bu oranların yaklaşık % 62, 60, 58 olduğu görülmektedir. Hücre canlılığı açısından iki çalışma arasında gözlenen bu farkın iki yöntemin petri ve 96 kuyulu plaka olmak üzere farklı yüzey alanı ve yüksekliğe sahip ortamlarda uygulanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 96 kuyulu plakada kuyuların petriye göre yüksekliğinin fazla olması UV-B ışınları açısından engel oluşturabileceği ve bu durumun plakada petriye göre daha yüksek canlılık oranlarının görülmesine bir neden olabileceği düşünülmektedir. Ancak plakada yapılan WST-1 yönteminde aynı deney setlerinde kontrol grubunun da UV-B dozlarına maruz bırakılması bu durumun dezavantaj olma olasılığını ortadan kaldırmıştır.

Kontrol hücreleri ile kıyaslandığında DMSO kontrol hücrelerinin UV-B hasarına karşı daha dirençli olduğu görülmektedir. Kakao yağı dilüsyonlarında ise UV-B ve yağ dozlarına bağlı olarak canlılığın azaldığı görülmektedir. WST-1 reaktifi ile inkübasyon öncesinde ters-faz mikroskopta incelenen kakao yağı dilüsyonlarında, WST-1 yöntemi ile belirlenen hücre canlılığında meydana gelen azalmanın hücrelerde yuvarlaklaşma, adezyon kaybı gibi morfojik deformasyonlarla da doğrulandığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar ile kakao yağının UV-B maruziyetine karşı hücrelerde koruyucu bir etkisinin olmadığı, aksine UV-

B ile hücrelerde oluşan hasarı arttırdığı kolorimetrik ve morfolojik olarak belirlendiği söylenebilmektedir.

Çizelge 4.12. Kayısı yağı dilüsyonları ve UV-B dozları kombinasyonunun CRL-2120 hücrelerinde canlılık üzerine etkisi

UVB (mJ/cm ²)	Hücre canlılığı (%)				
	KONTROL	DMSO (1µl/ml)	Kayısı yağı (µl/ml)		
			35.5	37	38.5
0	100	90.05	75.77	87.79	73.29
550	63.7	73.66	39.87	43.85	40.84
650	60.43	66.83	38.32	50.52	48.18
750	58.95	71.32	42.84	58.7	46.70

CRL-2120 hücrelerinde ise uygulanan kayısı yağı dilüsyonlarında UV-B dozları ile mumele sonrasında hücre canlılığında azalma olduğu görülmüştür (Çizelge 4.12). Ancak 35.5 µl/ml dilüsyonda UV-B dozlarında hücre canlılığının yakın oranlarda olduğu, 37 ve 38.5 µl/ml kayısı yağında ise artan UV-B dozlarında hücre canlılığının da artış gösterdiği görülmektedir. Bu anlamda kayısı yağı kakao yağına göre daha pozitif bir sonuç göstermiş olmasına rağmen hücre canlılığı kontrol grubu değerlerinden daha düşüktür.

Karetenoid, vitamin E ve C gibi besinsel içeriklerin antioksidan özelliklere sahip olmakla beraber UV maruziyeti sonrasında oluşan hücresel sinyal yanıtlara karşı koruyucu etkilerinin de oldukları bilinmektedir (Heinrich ve ark. 2006). Yeşil çay polifenollerini ile yapılan bir çalışmada UV-B maruziyeti öncesinde polifenollerin deri yüzeyine uygulanması, UV-B maruziyeti ile oluşan eritemal yanıtı engellediği ayrıca dermis ve epidermiste siklobütan dimer oluşumunu azalttığı belirlenmiştir (Katiyar 2000). Bae ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yeşil çay polifenolü olan epigallocateşin gallatın (EGCG) insan dermal hücreleri üzerinde UV-B muamelesi sonrasında meydana gelen kollajen yıkımı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla insan dermal hücrelerine 50-3000 mJ/cm² aralığında UV-B muamelesi yapılmış ve 100 mJ/cm² UV-B dozundan itibaren canlılığın azaldığı belirlenmiştir. EGCG konsantrasyonlarının 100 mJ/cm² UV-B muamelesi sonrasında azalan hücre canlılığında artışa neden olduğu belirlenmiştir. EGCG'nin toksik olmayan dozlarında UV-B indüklü ROS üretimini azalttığı gösterilmiştir. Çalışma ile epigallocateşin gallatın kollajen

yıkımını, UV-B ışınları ile oluşan fotoyaşlanmayı engellediği ortaya konmuştur (Bae ve ark. 2008). Kim ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise *Prunus persica* çiçeklerinden elde edilen ekstraktların insan fibroblast ve keratinosit hücrelerinde UV maruziyeti ile oluşan sitotoksik etkiye karşı koruyucu etki gösterdiği ortaya konmuştur (Kim ve ark. 2000). Keratinosit hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise UV-B maruziyeti sonrasında artan hücre ölümünün kateşin flavanoller tarafından azaltılmasıyla kateşinin UV-B ışınlarına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Wu ve ark. 2006).

Daha önce de belirtildiği gibi bitkisel kaynaklı doğal içeriklerin UV ışınlarına karşı koruyucu etki gösterdikleri bilinmektedir (Heinrich ve ark. 2006). Kakaoda bulunan başlıca flavanoidler kateşin, epikateşin ve ilgili prosiyanidin oligomerleridir (Steinberg ve ark. 2003). Kayısı meyvesi ise yağ, protein, lif, çözünebilir şeker, yağ asitleri; beta karoten, beta kriptoksantin, gama koroten ve likon gibi karetenoidler ve kateşin, epikateşin gibi fenolik bileşenler ve bazı mineraller açısından zengin bir kaynaktır (Erdogan ve ark.2011). Çalışmamızda halk arasında bronzlaştırıcı özelliği temel alınarak yaygın olarak kullanılan kakao ve kayısı yağlarının UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sağlıklı deri hücrelerine uygulanan uçucu yağların saf halde olmaması ve farklı bileşenleri de içeriğinde barındırması yağların içinde bulunan bileşenlerin tek başına gösterdiği koruyucu etkinin gözlenmemesine neden olarak düşünülebilir.

Sağlıklı deri hücrelerinde yağlar ile kombine olarak UV-B uygulaması sonucunda kakao ve kayısı yağlarının UV-B'nin yol açtığı sitotoksik etkiyi azaltmadığı aksine kombine etkinin daha fazla hasara neden olduğu görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen bulgular ışığında deriye uygulanan yağ miktarlarının önemi olduğu ve bu yağlar ile deriye muamele sonrasında güneşe uzun süre maruz kalmanın negatif etkiler doğurabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Aburjai, T. ve Natsheh, F. M. (2003), "Plants used in cosmetics," *Phytotherapy research : PTR*, **17(9)**, 987–1000.
- Afaq, F., Syed, D. N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.-H., Khan, N., Zaid, M.A. ve Mukhtar, H. (2007), "Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human Hacat keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis," *The Journal of investigative dermatology*, **127(1)**, 222–32.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2007), *Molecular Biology Of The Cell*, GarlandScience.
- Alenzi, F. Q., Lotfy, M. ve Wyse, R. (2010), "Swords of cell death: caspase activation and regulation," *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, **11(2)**, 271–80.
- Altunkaynak, B. Z. ve Özbek, E. (2008), "Programlanmış Hücre Ölümü : Apoptoz Nedir ?," *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **6(2)**, 93–104.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. ve Aggarwal B.B.(2008), "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes," *Pharmaceutical research*, **25(9)**, 2097–116.
- Atagün, G. Eren,Z. ve Gürkanlı, İ. (2011), "Apoptoziste Mitokondrinin Rolü," *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **4(2)**, 49-53.
- Attari, F., Sepehri, H., Delphi, L. ve Goliaei, B. (2009), "Apoptotic and necrotic effects of pectic acid on rat pituitary GH3/B6 tumor cells," *Iranian biomedical journal*, **13(4)**, 229–36.
- Ariffin, Z. S. H., Wan Omar, W. H. H., Zainal Ariffin, Z., Safian, M. F., Senafi, S. ve Megat Abdul Wahab, R. (2009), "Intrinsic anticarcinogenic effects of Piper sarmentosum ethanolic extract on a human hepatoma cell line," *Cancer cell international*, **9(6)**, 2867-9-6.
- Avelar, M. M. ve Cibebe, M. C. P. G., "Procyanidin B2 Cytotoxicity to MCF-7 Human Breast Adenocarcinoma Cells," *Insidan J Pharm Sci.*, **74(4)**: 351-355.

- Bae, J.-Y., Choi, J.-S., Choi, Y.-J., Shin, S.-Y., Kang, S.-W., Han, S. J. ve Kang, Y.-H. (2008), "(-)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase," *Food and chemical toxicology*, **46(4)**, 1298–307.
- Bai, L. ve Zhu, W. (2006), "p53 : Structure, Function and Therapeutic Applications," *Cancer Mol.*, **2(4)**, 141–153.
- Balint, E. ve Vousden, K. H. (2001), "Activation and activities of the p53 tumour suppressor," *British Journal of Cancer*, **285**, 1813–1823.
- Bao, Q. ve Shi, Y. (2007), "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases," *Cell death and differentiation*, **14(1)**, 56–65.
- Baptiste-okoh, N., Barsotti, A. M. ve Prives, C. (2008), "A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis," *PNAS*, **105(6)**, 1–6.
- Ben-porath, I. ve Weinberg, R. A. (2005), "The signals and pathways activating cellular senescence," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **37**, 961–976.
- Benassi, L., Magnoni, C., Giudice, S., Bertazzoni, G., Costi, M. P., Rinaldi, M., Venturelli, Coppi, A. ve Rossi, T.A. (2006), "Pharmacological and toxicological evaluation of a new series of thymidylate synthase inhibitors as anticancer agents," *Anticancer research*, **26(5A)**, 3499–504.
- Berliocchi, L., Ciociaro, A., Russo, R., Cassiano, M. G. V., Blandini, F., Rotiroti, D., Morrone, L. A. ve Corasaniti, M. T. (2011), "Toxic profile of bergamot essential oil on survival and proliferation of SH-SY5Y neuroblastoma cells," *Food and chemical toxicology*, **49(11)**, 2780–92.
- Biniek, K., Levi, K. ve Dauskardt, R. H. (2012), "Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109(42)**, 17111–6.
- Borrello, M. G., Degl’Innocenti, D. ve Pierotti, M. A. (2008), "Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection," *Cancer letters*, **267(2)**, 262–70.
- Bouchier-Hayes, L. (2010). "The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis," *Journal of cellular and molecular medicine*, **14(6A)**, 1212–24.

- Bouchier-Hayes, L ve Green, D. R. (2012), "Caspase-2: the orphan caspase, "*Cell death and differentiation*, **19(1)**, 51–7.
- Brady, C. A. ve Attardi, L. D. (2010), "P53 At a Glance," *Journal of cell science*, **123**, 2527–32.
- Brate, A. O. ve Giannakakou, P. (2003), "The importance of p53 location : nuclear or cytoplasmic zip code ?," *Drug Resistance Updates*, **6**, 313–322.
- Brooks, C. L. ve Gu, W. (2003), "Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation," *Current Opinion in Cell Biology*, **15(2)**, 164–171.
- Bury, J. ve Cross, S. (2003), "Molecular biology in diagnostic histopathology : Part1-The cell cycle," *Current Diagnostic Pathology*, **9**, 266--275.
- Cabadak, H. (2008), "Hücre siklusu ve kanser, "*ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **9(3)**, 51 - 61.
- Campisi, J. (2003), "Cancer and ageing: rival demons?," *Nature reviews. Cancer*, **3(5)**, 339–49.
- Carnésecchi, Sc., Schneider, Y., Lazarus, S. a, Coehlo, D., Gossé, F. ve Raul, F. (2002), "Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells, "*Cancer letters*, **175(2)**, 147–55.
- Cheah, P., Frcpath, M. ve Lai-meng, L. (2001), "p53 : an overview of over two decades of study," *Malaysian J Path.*, **23(1)**, 9–16.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. ve Bhat, G. K. (2008), "Caspases - an update,"*Comparative biochemistry and physiology. Part B*, **151(1)**, 10–27.
- Chumakov, P. M. (2007), "Versatile Functions of p53 Protein in Multicellular Organisms," *Biochemistry (Mosc)*, **72(13)**, 1399–1421.
- Cooper, G. M. ve Hausman, R. E. (2006), *Hücre Moleküler Yaklaşım*, (Ed. Sakızlı, M. ve Atabey, N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir.
- Coutts, A. S., Adams, C. J. ve Thangue, N. B. L. (2009), "p53 ubiquitination by Mdm2 : A never ending tail ?," *DNA Repair*, **8**, 483–490.
- Croce, C. M. (2008), "Oncogenes and cancer," *The New England journal of medicine*, **358(5)**, 502–11.

- Cui, Y., Lu, Z., Bai, L., Shi, Z., Zhao, W.-E. ve Zhao, B. (2007), "beta-Carotene induces apoptosis and up-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and reactive oxygen species production in MCF-7 cancer cells," *European journal of cancer*, **43(17)**, 2590–601.
- Çefle, K. (2003), "P53 Tümör süpresör geni," *İst. Tıp Fak .Mecmuası*, **66(2)**, 121-126.
- Çoğulu, Ö., Alpman, A., Durmaz, B. ve Özkınay, F.(2007), "Mitoz ve Mayozun Moleküler Temelleri," *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, **27**, 725-737.
- Davis, S. C. ve Perez, R. (2009), "Cosmeceuticals and natural products: wound healing," *Clinics in dermatology*, **27(5)**, 502–6.
- de Gruijl, F. R., van Kranen, H. J. ve Mullenders, L. H. (2001), "UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer," *Journal of photochemistry and photobiology: B, Biology*, **63(1-3)**, 19–27.
- Debeleç-Bütüner, B. ve Kantarcı, G. (2006). " Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi," *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, **35(2)**, 149–170.
- Demirelli, F. (2003), "Kanserin Moleküler Genetik Temelleri," *Güncel Klinik Onkoloji*, **37**, 9-15.
- Di Cintio, A., Di Gennaro, E. ve Budillon, A. (2010), "Restoring p53 function in cancer: novel therapeutic approaches for applying the brakes to tumorigenesis," *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, **5(1)**, 1–13.
- Dikmen, M. Öztürk, N. ve Öztürk, Y. (2008), "Nar Meyve Kabuğu Ekstresinin Mcf-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Sitotoksik ve İnhibitör Etkileri," *J. Fac. Pharm*, **37(3)**, 179–190.
- Dilsiz, N., (2004), *Moleküler Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Duke, R. C. (2004), "Methods of analysing chromatin changes accompanying apoptosis of target cells in killer cell assays," *Methods in Molecular Biology*, **282**, 43–66.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T. ve Vandenabeele, P. (2009), "Major cell death pathways at a glance," *Microbes and infection*, **11(13)**, 1050–62.
- Edinger, A. L. ve Thompson, C. B. (2004), "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy," *Current opinion in cell biology*, **16(6)**, 663–9.

- Elmore, S. (2007), "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol Pathol.*, **35(4)**, 495–516.
- Erdogan-Orhan, I. ve Kartal, M. (2011), "Insights into research on phytochemistry and biological activities of *Prunus armeniaca* L. (apricot)," *Food Research International*, **44(5)**, 1238–1243.
- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O.A., Baltacı, D., Oktay, M. ve Çolakoğlu S. (2012), "Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması)," *Düzce tıp dergisi*, **14(2)**, 87–101.
- Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S. ve Liang, J. (2005), "Caspase Family Proteases and Apoptosis," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **37(11)**, 719–727.
- Ferbeyre, G., Stanchina, E., Lin, A. W., Querido, E. M., McCurrach, M.E., Hannon, G. J. ve Lowe S. W. (2002), "Oncogenic ras and p53 Cooperate To Induce Cellular Senescence," *Molecular And Cellular Biology*, **22(10)**, 3497–3508
- Fuster, J. J., Sanz-González, S. M., Moll, U. M. ve Andrés, V. (2007), "Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy," *Trends in molecular medicine*, **13(5)**, 192–9.
- Foster, I. (2008), "Cancer: A cell cycle defect," *Radiography*, **14(2)**, 144–149.
- Fotakis, G. ve Timbrell, J. A. (2006), "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicology letters*, **160(2)**, 171–7.
- Fridman, J. S. ve Lowe, S. W. (2003), "Control of apoptosis by p53," *Oncogene*, **22(56)**, 9030–40.
- Gaddameedhi, S., Selby, C. P., Kaufmann, W. K., Smart, R. C. ve Sancar, A. (2011), "Control of skin cancer by the circadian rhythm," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108(46)**, 1-6.
- Gandini, S., Raimondi, S., Gnagnarella, P., Doré, J.-F., Maisonneuve, P. ve Testori, A. (2009), "Vitamin D and skin cancer: a meta-analysis," *European journal of cancer*, **45(4)**, 634–41.
- Geller, A. C. ve Annas, G. D. (2003), "Epidemiology of Melanoma and Skin Cancer," *Seminars in Ontology Nursing*, **19(1)**, 2–11.

- Ghelli, A., Zanna, C., Porcelli, A. M., Schapira, A. H. V., Martinuzzi, A., Carelli, V. ve Rugolo, M. (2003), "Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium," *The Journal of biological chemistry*, **278(6)**, 4145–50.
- Giono, L. E. ve Manfredi, J. J. (2006), "The p53 Tumor Suppressor Participates in Multiple Cell Cycle Checkpoints" *Journal of Cellular Physiology*, **209**, 13–20.
- Gostissa, M., Ranganath, S., Bianco, J. M. ve Alt, F. W. (2009)," Chromosomal location targets different MYC family gene members for oncogenic translocations," *PNAS*, **106(7)**, 2265–70.
- Gültekin. N., Karaoğlu, K. ve Küçükateş, E. (2008), "Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yani potansiyel tedavi stratejileri," *Türk. KardiyolDern. Arş.*, **36(2)**, 120-130.
- Güneş, H. V. (2003), *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan Kitabevi, Eskişehir.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. ve Riley, T. V. (1999), "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts," *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 985–990.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2000), "The Hallmarks of Cancer," *Cell*, **100**, 57–70.
- Harms, K. L. ve Chen, X. (2006), "The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties," *Cell death and differentiation*, **13(6)**, 890–7.
- Harrington, K. J. (2011), "Biology of cancer," *Medicine*, **39(12)**, 689–692.
- Heinrich, U., Neukam, K., Tronnier, H., Sies, H. ve Stahl, W. (2006), "Nutrition and Disease Long-Term Ingestion of High Flavanol Cocoa Provides Photoprotection against UV-Induced Erythema and Improves Skin Condition in Women," *The Journal of Nutrition*, **136**, 1565–1569.
- Ho, L. H., Taylor, R., Dorstyn, L., Cakouros, D., Bouillet, P. ve Kumar, S. (2009), "A tumor suppressor function for caspase-2," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106(13)**, 5336–41.

- Horie, N., Hirabayashi, N., Takahashi, Y., Miyauchi, Y., Taguchi, H. ve Takeishi, K. (2005), "Synergistic effect of green tea catechins on cell growth and apoptosis induction in gastric carcinoma cells," *Biological & pharmaceutical bulletin*, **28(4)**, 574–9.
- http://www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17507-Premixed
WST-1 Cell. Proliferation Reagent. Cat. No:630118.
- http://www.promokine.info/fileadmin/PDFs/All_PDFs/PK-CA577-K182-100.pdf
Green Caspase-2 Staining Kit. Cat No: PK-CA577-K182-100.
- Huang, X., Lee, S. ve Chen, X. (2011), "Design of “smart” probes for optical imaging of apoptosis," *American journal of nuclear medicine and molecular imaging*, **1(1)**, 3–17.
- Hudson, D., Kovalchuk, I., Koturbash, I., Kolb, B., Martin, O. A. ve Kovalchuk, O. (2011), "Induction and persistence of radiation-induced DNA damage is more pronounced in young animals than in old animals," *Aging*, **3(6)**, 609–20.
- Hussein, M. R. (2005), "Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms," *J Cutan Pathol*, **32**, 191–205.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. ve Horikawa, T. (2003), "UV-induced skin damage," *Toxicology*, **189(1-2)**, 21–39.
- Israels, E.D.ve Israels, L.G. (2000), "The CellCycle," *Oncologist*, **5**, 510–513.
- İnci, A., Yildirim, A., Yavuz, A. ve Düzlü, Ö. (2009), "Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis," *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.*, **6(2)**, 121-133.
- Ji, C., Yang, Y., Yang, Z., Tu, Y., Cheng, L., Chen, B., Xia, J., Sun, W., Su, Z., He, L. ve Bi, Z. (2012), "Perifosine sensitizes UVB-induced apoptosis in skin cells: new implication of skin cancer prevention?," *Cellular signalling*, **24(9)**, 1781–9.
- Joerger, A. C. ve Fersht, A. R. (2008), "Structural biology of the tumor suppressor p53," *Annual review of biochemistry*, **77**, 557–82.

- Jourdain, C., Tenca, G., Deguercey, A. ve Poelman, T.P. (2006), "In-vitro effects of polyphenols from cocoa and beta-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells, " *Eur J Cancer Prev.*, **15(4)**:353-61.
- Jun, S. (2010), "DNA Chemical Damage and Its Detected," *International Journal of Chemistry*, **2(2)**, 261–265.
- Kanavy, H. E. ve Gerstenblith, M. R. (2011), "Ultraviolet radiation and melanoma," *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, **30(4)**, 222–8.
- Kang, M. R., Kang, J. S., Han, S.-B., Kim, J. H., Kim, D.-M., Lee, K., Lee, C. W., Chang Woo Lee a, Lee K. H., Lee C. H., Han, G., Kang, J. S.Kim,H. M. ve Park S.-K. (2009), "A novel delta-lactam-based histone deacetylase inhibitor, KBH-A42, induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells," *Biochemical pharmacology*, **78(5)**, 486–94.
- Kang, N. J., Shin, S. H., Lee, H. J. ve Lee, K. W. (2011), "Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis," *Pharmacology & therapeutics*, **130(3)**, 310–24.
- Karp, G. (2010), *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, John Wiley & Sons, Californiya.
- Katiyar,S. K., Mukhtar,H. ve Perez,A. (2000), "Green Tea Polyphenol Treatment to Human Skin Prevents Formation of Ultraviolet Light B-induced Pyrimidine Dimers in DNA Green Tea Polyphenol Treatment to Human Skin Prevents Formation of Ultraviolet Light B-induced Pyrimidine," *Clinical Cancer Research*, **6**, 3864–3869.
- Keeney, S., McKenna, H., Fleming, P. ve McIlfatrick, S. (2009), "Attitudes, knowledge and behaviours with regard to skin cancer: a literature review," *European journal of oncology nursing*, **13(1)**, 29–35.
- Kim, Y. H., Yang, H. E., Kim, J. H., Heo, M. Y. ve Kim, H. P. (2000), "Protection of the flowers of *Prunuspersica* extract from ultraviolet B-induced damage of normal human keratinocytes," *Archives of Pharmacal Research*, **23**, 396-400.
- Koçak, N., Yıldırım, İ. H. ve CingYıldırım, S. (2011), "p53ve p53gen ailesi üyeleri olan p63ve p73'ün hücrel işlevleri," *Dicle Tıp Dergisi*, **38(4)**, 530-535

- Kopnin, B. P. (2000), "Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis," *Biochemistry*, **65**(1), 2–27.
- Krauss, P. G. (2003), *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Kumar, A., Malik, F., Bhushan, S., Sethi, V. K., Shahi, A. K., Kaur, J., Taneja, S. C., Qazi, G. N. ve Singh, J. (2008), "An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells," *Chemico-biological interactions*, **171**(3), 332–47.
- Kumar, S. (2009), "Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more?," *Nature reviews. Cancer*, **9**(12), 897–903.
- Lai, D., Visser-Grieve, S. ve Yang, X. (2012), "Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response," *Bioscience reports*, **32**(4), 361–74.
- Lam, M., Carmichael, A. R. ve Griffiths, H. R. (2012), "An aqueous extract of *Fagonia cretica* induces DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells via FOXO3a and p53 expression," *PloS one*, **7**(6), e40152.
- Larsson, O. (2005), "Cellular senescence-an integrated perspective," *Cancer Therapy*, **3**, 495–510.
- Latonen, L. ve Laiho, M. (2005), "Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53," *Biochimica et biophysica acta*, **1755**(2), 71–89.
- Lawen, A. (2003), "Apoptosis-an introduction," *BioEssays*, **25**(9), 888–96.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J. ve Lee, C. Y. (2003), "Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine," *Journal of agricultural and food chemistry*, **51**(25), 7292–5.
- Li, H., Qi, Y., Li, C., Braseth, L. N., Gao, Y., Shabashvili, A. E., Katovich, M. J. ve Sumners, C. (2009), "Angiotensin type 2 receptor-mediated apoptosis of human prostate cancer cells," *Molecular cancer therapeutics*, **8**(12), 3255–65.
- Li, J. ve Yuan, J. (2008), "Caspases in apoptosis and beyond," *Oncogene*, **27**(48), 6194–6206.

- Liang, S. H. ve Clarke, M. F. (2001), "Regulation of p53 localization," *European journal of biochemistry / FEBS*, **268(10)**, 2779–83.
- Malumbres, M. ve Barbacid, M. (2001), "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer," *Nature reviews. Cancer*, **1(3)**, 222–31.
- Martinez-rivera, M. ve Siddik, Z. H. (2012), "Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type," *Biochemical Pharmacology*, **83(8)**, 1049–1062.
- Mastrangelo, A. J. ve Betenbaugh, M. J. (1998), "Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems," *Trends in biotechnology*, **16(2)**, 88–95.
- Michael, D. ve Oren, M. (2003), "The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system," *Seminars in Cancer Biology*, **13(1)**, 49–58.
- Millau, J.-F., Bastien, N. ve Drouin, R. (2009), "P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts," *Mutation research*, **681(2-3)**, 118–33.
- Mosmann, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of immunological methods*, **65(1-2)**, 55–63.
- Müller, K., Carpenter, K. L. H., Challis, I. R., Skepper, J. N. ve Arends, M. J. (2002), "Carotenoids Induce Apoptosis in the T-lymphoblast Cell Line Jurkat E6.1," *Free radic Res*, **36**, 791-802.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N. ve Fox, J. L. (2010), "Ultraviolet radiation and skin cancer," *International Journal of Dermatology*, **49**, 978–986.
- Natan, E., Baloglu, C., Pagel, K., Freund, S. M. V., Morgner, N., Robinson, C. V., Fersht, A. R. ve Joerger, A. C. (2011), "Interaction of the p53 DNA-binding domain with its n-terminal extension modulates the stability of the p53 tetramer," *Journal of molecular biology*, **409(3)**, 358–68.
- Naussbaum, R.L. (2005), *Tıbbi Genetik*, Thompson & Thompson, Güneş Kitabevi.

- Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W. ve Bhunia, A. K. (2008), "WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line," *Journal of microbiological methods*, **73(3)**, 211–5.
- O'Brien, M. ve Kirby, R. (2008), "Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease," *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **18(6)**, 572–585.
- Oliveira, P. A., Colaço, A., Chaves, R. ve Guedes-pinto, H., De-La-Cruz P.L.F ve Lopes, C.(2007), "Chemical carcinogenesis," *An Acad Bras Cienc.*, **79**, 593–616.
- Oliver, L. ve Vallette, F. M. (2005), "The role of caspases in cell death and differentiation," *Drug resistance updates*, **8(3)**, 163–70.
- Oliver, T. G., Meylan, E., Chang, G. P., Xue, W., Burke, J. R., Humpton, T. J., Hubbard, D., Bhutkar, A. ve Jacks, T. (2012), "Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates p53-induced positive feedback loop," *Mol Cell*, **43(1)**, 57–71.
- Osborne, C., Wilson, P. ve Tripathy, D.(2004), "Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications," *The Oncologist*, **9**, 361-377.
- Ozaki, T. ve Nakagawara, A. (2011), "p53 : The Attractive Tumor Suppressor in the Cancer Research Field," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2011**, 28–30.
- Öktem, S., Özhan, M. H. ve Özol, D. (2001), "Apoptozisin Önemi," *Toraks Dergisi*, **2(1)**, 91-95 .
- Ölgen S., Bıçak I. ve Nebioğlu D.(2002),"Angiogenesis ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar," *AnkaraEcz.Fak.Derg.*, **31(3)**, 193–214.
- Özgenel, G. Y., Kahveci, R. ve Özcan, M. (2002), "Malign Melanomda Tedavi Prensiplerimiz ve Sonuçlarımız," *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **28(1)**, 13–16.

- Palozza, P., Serini, S., Torsello, A., Boninsegna, A., Covacci, V., Maggiano, N., Ranelletti, Wolf, F. I. ve Calviello, G. (2002), "Regulation of cell cycle progression and apoptosis by β -carotene in undifferentiated and differentiated hl-60 leukemia cells: possible involvement of a redox mechanism," *Int. J. Cancer*, **600**, 593–600.
- Papaliagkas, V., Anogianaki, a, Anogianakis, G. ve Ilonidis, G. (2007), "The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals," *Hippokratia*, **11(3)**, 108–13.
- Park, H.-J., Yoon, S.-H., Han, L.-S., Zheng, L.-T., Jung, K.-H., Uhm, Y.-K., Lee, J.-H., Jeong, J.-S., Joo, W.-S., Yim, S.-V., Chung, J.-H. ve Hong S.-P. (2005), "Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells," *World journal of gastroenterology*, **11(33)**, 5156–61.
- Pauloin, T., Dutot, M., Joly, F., Warnet, J.-M. ve Rat, P. (2009), "High molecular weight hyaluronan decreases UVB-induced apoptosis and inflammation in human epithelial corneal cells," *Molecular vision*, **15**, 577–83.
- Pecorino, L. (2008), *Molecular Biology Of Cancer*, Oxford University Press.
- Pires, L., Cascardo, M., Lambert, S. V. ve Figueira, A. (1998), " Increasing cocoa butter yield through genetic improvement of Theobroma cacao L.: Seed fat content variability, inheritance and association with seed yield," *Euphytica*, **103**, 115–121.
- Pons, M. ve Quintanilla, M. (2006), "Molecular biology of malignant melanoma and other cutaneous tumors", *Clin Transl Oncol.*, **8(7)**, 466-74.
- Pop, C. ve Salvesen, G. S. (2009), "Human caspases: activation, specificity, and regulation," *The Journal of biological chemistry*, **284(33)**, 21777–81.
- Qian,Y.ve Chen,X.(2011), "Tumor suppression by p53: making cells senescent," *Histol Histopathol.*, **25(4)**, 515–526.
- Ramljak, D., Romanczyk, L. J., Metheny-barlow, Thompson, Knezevic, V., Galperin, M. Ramesh, A.ve Dickson, R. B. (2005), "Pentameric procyanidin from Theobroma cacao selectively inhibits growth of human breast cancer cells," *Mol Cancer Ther.*, **4(4)**, 537–546.

- Raju, J., Patlolla, J. M. R., Swamy, M. V., Raju, J., Patlolla, J. M. R., Swamy, M. V. ve Rao, C. V. (2004), "Diosgenin, a Steroid Saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation in F344 Rats and induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **13(8)**, 1392-1398.
- Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B. ve Sinha, R. P. (2010), "Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair," *Journal of nucleic acids*, **2010**, 1-32.
- Rastogi, R. P. ve Sinha, R. P. (2009). "Apoptosis : Molecular mechanisms and pathogenicity," *EXCLI Journal*, **8**, 155-181.
- Reddy, L., Odhav, B. ve Bhoola, K. D. (2003), "Natural products for cancerprevention: a global perspective," *Pharmacology & Therapeutics*, **99(1)**, 1–13.
- Regula, K. M. ve Kirshenbaum, L. A. (2005), "Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end," *Journal of molecular and cellular cardiology*, **38(1)**, 3–13.
- Reichrath, J. (2006), "The challenge resulting from positive and negative effects of sunlight: how much solar UV exposure is appropriate to balance between risks of vitamin D deficiency and skin cancer?", *Progress in biophysics and molecular biology*, **92(1)**, 9–16.
- Rieger, P. T. (2004), "The biology of cancer genetics," *Seminars in Oncology Nursing*, **20(3)**, 145–154.
- Rigel, D. S. (2010), "Epidemiology of melanoma," *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, **29(4)**, 204–9.
- Ríos, J. C., Repetto, G., Jos, A., del Peso, A., Salguero, M., Cameán, A. ve Repetto, M. (2003), "Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells in vitro," *Toxicology in Vitro*, **17(5-6)**, 635–641.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C. ve Vousden, K. H. (2001), "Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein," *Current opinion in cell biology*, **13(3)**, 332–7.

- Sacha, T., Zawada, M., Hartwich, J., Lach, Z., Polus, A., Szostek, M., Zdziyowska, E., Libura, M. Bodzioch, M., Dembin'ska-Kiec', A.B., Skotnicki, A., Go'ralczyk, R., Wertz, K., Georges, R., Moele, C., Langmann, T. ve Schmitz, G. (2005), "The effect of beta-carotene and its derivatives on cytotoxicity, differentiation, proliferative potential and apoptosis on the three human acute leukemia cell lines: U-937, HL-60 and TF-1," *Biochimica et biophysica acta*, **1740(2)**, 206–14.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. ve Vandenabeele, P. (2004), "Toxic proteins released from mitochondria in cell death," *Oncogene*, **23(16)**, 2861–74.
- Scherer, D. ve Kumar, R. (2010), "Genetics of pigmentation in skin cancer--a review," *Mutation research*, **705(2)**, 141–53.
- Scherliess, R. (2011), "The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells," *International journal of pharmaceutics*, **411(1-2)**, 98–105.
- Schröterová, L., Králová, V., Voráčová, A., Hasková, P., Rudolf, E. ve Cervinka, M. (2009), "Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays," *Toxicology in vitro*, **23(7)**, 1406–11.
- Sehgal., J, Siddheswaran, P., Kumar. K.L.S. ve Karthiyayini, T. (2010), "Anti-tubercular Activity of fruits of *Prunus armeniaca* (L .) Anti-tubercular Activity of fruits of *Prunus armeniaca* (L .)," *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **1(2)**, 1–4.
- Shang, X. J., Yao, G., Ge, J. P., Sun, Y., Teng, W. H. ve Huang, Y. F. (2009), "Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner," *Journal of andrology*, **30(2)**, 122–6.
- Sharma, M., Agrawal, S. K., Sharma, P. R., Chadha, B. S., Khosla, M. K. ve Saxena, a K. (2010), "Cytotoxic and apoptotic activity of essential oil from *Ocimumviride* towards COLO 205 cells," *Food and chemical toxicology*, **48(1)**, 336–44.
- Sherr, C. J. (2004), "Principles of Tumor Suppression," *Cell*, **116**, 235–246.

- Shu, K.-X., Li, B. ve Wu, L.-X. (2007), "The p53 network: p53 and its downstream genes," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **55(1)**, 10–8.
- Singh, A., Bastian, T. S., Ceena Denny, E. ve Varghese, V. I. (2010), "Apoptosis - A Review," *Oral & Maxillofacial Pathology Journal*, **2**, 976-1225.
- Solakoğlu, Z., "Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni," *Klinik gelişim*, **22(3)**, 20-25.
- Sœur, J., Marrot, L., Perez, P., Iraqui, I., Kienda, G., Dardalhon, M., Meunier, Averbeck, D. ve Huanga M.-E. (2011), "Selective cytotoxicity of Aniba rosaeodora essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis," *Mutation research*, **718(1-2)**, 24–32.
- Steinberg, F. M., Bearden, M. M. ve Keen, C. L. (2003), "Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health," *Journal of the American Dietetic Association*, **103(2)**, 215–23.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W. ve Villanueva, A. (2012), "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets," *Acta histochemica*, **114(8)**, 785–96.
- Suzuki, K. ve Matsubara, H. (2011), "Recent advances in p53 research and cancer treatment," *Journal of biomedicine & biotechnology*, **2011**, 1-7.
- Şevik, M.(2012). "Oncogenic viruses and mechanisms of oncogenesis," *Türk. J. Vet. Anim. Sci.*, **36(4)**, 323–329.
- Tan, X., Hu, D., Li, S., Han, Y., Zhang, Y. ve Zhou, D. (2000), "Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells," *Cancer letters*, **158(1)**, 1–6.
- Tavares, A. C., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Lopes, M. C., Canhoto, J. ve Salgueiro, L. R. (2008), "Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity," *Journal of ethnopharmacology*, **119(1)**, 129–34.
- Tekbaş,Ö. F. ve Evci,D. (2005), "Yaklaşan yaz mevsimi ile artan bir tehlike : güneş kaynaklı ultraviyole," *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, **4(2)**, 98-107.

- The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (2003) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/invidocs/phIIIprot/nhkphIII.pdf>
- Tomatır, A. G. (2003), "Apoptoz : Programlı Hücre Ölümü," *T Klin J Med Sci.*, **23**, 499-508.
- Tyson, J. J., Csikasz-Nagy, A. ve Novak, B. (2002), "The dynamics of cell cycle regulation," *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **24**(12), 1095–109.
- Ulukaya, E., Acilan, C. ve Yilmaz, Y. (2011), "Apoptosis: why and how does it occur in biology?" *Cell biochemistry and function*, **29**(6), 468–80.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Orrenius, S. ve Zhivotovsky, B. (2006), "Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage," *Oncogene*, **25**, 5683–5692.
- Vega-Avila, E. ve Pugsley, M. K. (2011), "An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells," *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, **54**, 10–4.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. ve Berneman, Z. N. (2003), "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer," *Cell proliferation*, **36**(3), 131–49.
- Viadiu, H. (2008), "Molecular architecture of tumor suppressor p53," *Current topics in medicinal chemistry*, **8**(15), 1327–34.
- Vousden, K. H. (2001), "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein," *British Journal of Cancer*, **85**(12), 1813–1823.
- Vousden, K. H. (2002), "Activation of the p53 tumor suppressor protein," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1602**, 47-59.
- Vousden, K. H. ve Prives, C. (2009), "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53," *Cell*, **3**, 413–431.
- Wang, W., Rastinejad, F. ve El-deiry, W. S. (2003), "Restoring p53-Dependent Tumor Suppression," *Cancer Biology & Therapy*, **1**, 55–63.
- Weinberg, R.A. (2013), *The Biology Of Cancer*, Garland Science.

- Weyermann, J., Lochmann, D. ve Zimmer, A. (2005), "A practical note on the use of cytotoxicity assays," *International journal of pharmaceutics*, **288(2)**, 369–76.
- Williams, G. H. ve Stoeber, K. (2012), "The cell cycle and cancer," *The Journal of pathology*, **226(2)**, 352–64.
- Wong, R. S. Y. (2011), "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment," *Journal of experimental ve clinical cancer research : CR*, **30(1)**, 87.
- Wu, M., Ding, H-F. ve Fisher, D.E. (2001), "Apoptosis : Molecular Mechanisms," *Encyclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group / www.els.net.
- Wu, W.-B., Chiang, H.-S., Fang, J.-Y., Chen, S.-K., Huang, C.-C. ve Hung, C.-F. (2006), "(+)-Catechin prevents ultraviolet B-induced human keratinocyte death via inhibition of JNK phosphorylation," *Life sciences*, **79(8)**, 801–7.
- Yamauchi, R., Sasaki, K. ve Yoshida, K. (2009), "Identification of epigallocatechin-3-gallate in green tea polyphenols as a potent inducer of p53-dependent apoptosis in the human lung cancer cell line A549," *Toxicology in vitro*, **23(5)**, 834–9.
- Yagura, T., Makita, K., Yamamoto, H., Menck, C. F. M. ve Schuch, A. P. (2011), "Biological sensors for solar ultraviolet radiation," *Sensors*, **11(4)**, 4277–94.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karatağ, M., Tanyolaç, B. (2007), *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara
- Yılmaz, E. ve Altunok, V. (2011), "Kanser ve p53 Geni," *Avkae dergisi*, **1**:19-23.
- Yiğit, D., Yiğit, N. ve Mavi, A. (2009), "Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels," *Brazilian journal of medical and biological research*, **42(4)**, 346–52.
- Yih L.-H. ve Lee T.-C. (2000), "Arsenite Induces p53 Accumulation through an ATM-dependent Pathway in Human Fibroblasts," *Cancer Research*, **60**, 6346 -6352.
- Yoshida, J., Ishibashi, T. ve Nishio, M. (2007), "G1 cell cycle arrest by amlodipine, a dihydropyridine Ca²⁺ channel blocker, in human epidermoid carcinoma A431 cells," *Biochemical pharmacology*, **73(7)**, 943–53.

- Yurt, B. ve Çelik, I. (2011), "Hepatoprotective effect and antioxidant role of sun, sulphited-dried apricot (*Prunus armeniaca* L.) and its kernel against ethanol-induced oxidative stress in rats," *Food and chemical toxicology*, **49(2)**, 508–13.
- Zhang, R., Mayhood, T., Lipari, P., Wang, Y., Durkin, J., Syto, R., Gesell, J., McNemar, C. ve Windsor, W. (2004), "Fluorescence polarization assay and inhibitor design for MDM2/p53 interaction," *Analytical biochemistry*, **331(1)**, 138–46.
- Zhivotovsky, B. ve Orrenius, S. (2005), "Caspase-2 function in response to DNA damage," **331**, 859–867.
- Ziegler, U. (2004), "Morphological Features of Cell Death," *News in Physiological Sciences*, **19(3)**, 124–128.
- Zilfou, J. T. ve Lowe, S. W. (2009), "Tumor suppressive functions of p53," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **1(5)**, 1-13.
- Zimmermann, K. C., Bonzon, C. ve Green, D. R. (2001), "The machinery of programmed cell death," *Pharmacology & therapeutics*, **92(1)**, 57–70.