



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Doktora Tezi

GLYCİNE MAX HÜCRE SÜSPANSİYON EKSTRAKTININ B16-F10
MELANOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDE ANTİ-MELANOGENEZ
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Yıldız BODURLAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr.Mahmut ÇALIŞKAN**

Haziran, 2020

İSTANBUL

Bu alışma,17.06.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafındanBiyoloji Anabilim Dalı,Zooloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr.Mahmut ALIşKAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakóltesi

Prof. Dr.Fatma Gül ÖZCAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakóltesi

Prof. Dr.Engin ULUKAYA
İstinye Üniversitesi
Sağık Bilimleri Fakóltesi

Prof. Dr.İ. Halil KAVAKLI
Koç Üniversitesi
Fen Fakóltesi

Doç. Dr.Mehmet Rıfkı TOPUL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakóltesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 7170180 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, anlayış ve desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN'a,

Tez çalışmalarımı ACTV Biyoteknoloji AR-GE laboratuvarlarında yürütebilme imkanı sağlayan, her zaman desteğini hissettiğim genel müdürüm Dr. Yakup BAKIR'a,

Çalışmalarım boyunca destekleri için arkadaşlarım Dr. Vahap ELDEM, Gurbet KORKMAZ Ayşenur ÇALLI, Begüm ERKÖK ve Hediye ÖZTOP'a,

Tez çalışmalarının gerçekleşmesine katkıda bulunan 1507- TÜBİTAK KOBİ Ar-Ge Başlangıç Destek Programına,

Her zaman desteklerini hissettiğim değerli Anneme, Babama ve Kardeşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2020

Yıldız BODURLAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. MELANOGENEZ	3
2.1.1. Melanogenezi Düzenleyen Sinyal Yolakları.....	6
2.1.2. Hiperpigmentasyon ve Tedavi Yaklaşımları.....	8
2.1.3. Fenolik Bileşikler ve Hiperpigmentasyona Etkileri	11
2.2. BİTKİ HÜCRE KÜLTÜRÜ	13
2.2.1. Bitki Hücre Kültürü ile Sekonder Metabolit Üretimi.....	15
2.2.2. Bitki Hücre Kültürünün Kozmetikte Kullanımı	19
3. MALZEME VE YÖNTEM	22
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	22
3.2. BİTKİ DOKU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	23
3.2.1. Besin Ortamlarının Hazırlanması.....	23
3.2.2. <i>In Vitro</i> Fidelerinin Elde Edilmesi	26
3.2.3. Kallus Kültürü.....	26
3.2.4. Süspansiyon Kültürü	27
3.2.5. Hücre Çoğalma ve Canlılık Testleri.....	27
3.3. EKSTRAKSİYON.....	28
3.4. FOLIN CIOCALTEU YÖNTEMİ İLE TOPLAM FENOLİK BİLEŞEN ANALİZİ.....	28
3.5. LC-MS/MS ANALİZİ	29
3.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ HAZIRLANIŞI	32

3.7. MTT CANLILIK TESTİ İLE MİTOKONDRIYAL AKTİVİTE BELİRLENMESİ.....	32
3.8. <i>IN VİTRO</i> MELANİN İÇERİK TESTİ.....	34
3.9. <i>IN VİTRO</i> ANTİ-TİROZİNAZ AKTİVİTE TESTİ	34
3.10. RT-QPCR ANALİZİ İLE MELANOGENEZ İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ.....	35
3.10.1. RNA İzolasyonu.....	36
3.10.2. cDNA sentezi	37
3.10.3. RT-qPCR Analizi	38
3.11. MELANOGENEZ İLİŞKİLİ PROTEİNLERİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE ANALİZİ	40
3.11.1 Protein İzolasyonu.....	40
3.11.2. SDS-PAGE ile Proteinlerin Ayırıştırılması.....	41
3.11.3. Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarımı	41
3.11.4. Membranların Bloklanması, Primer ve Sekonder Antikorlar ile İnkübasyonu	42
3.11.5. Kromojenik Substrat ile İnkübasyon ve Proteinlerin Görüntülenmesi	42
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	43
4. BULGULAR	44
4.1. <i>IN VİTRO</i> SOYA FİDELERİNİN ELDE EDİLMESİ.....	44
4.2. <i>IN VİTRO</i> SOYA FİDELERİNDEN KALLUS ELDE EDİLMESİ.....	44
4.3. SOYA HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI	47
4.4. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK MİKTARININ BELİRLENMESİ.....	48
4.5. SOYA HÜCRE EKSTRAKTINDAKİ FENOLİK BİLEŞİKLERİN LC-MS/MS ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ	49
4.6. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ B16-F10 FARE MELANOMA HÜCRELERİNİN CANLILIĞINA ETKİSİ.....	52
4.7. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ İNSAN NORMAL DERMAL FİBROBLAST HÜCRELERİNİN CANLILIĞINA ETKİSİ	52
4.8. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ <i>IN VİTRO</i> MELANİN İÇERİĞİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ	53
4.9. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ <i>IN VİTRO</i> ANTİ-TİROZİNAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	56
4.10. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ TİROZİNAZ İLİŞKİLİ GENLERİN İFADESİNE ETKİSİNİN RT-QPCR ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ	57
4.11. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ TİROZİNAZ İLİŞKİLİ PROTEİNLERİN İFADESİNE ETKİSİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ.....	61

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR.....	76
EKLER.....	85
EK 1. Glisitin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü.....	85
EK 2. Glisitin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi.....	85
EK 3. Daidzin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	86
EK 4. Daidzin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	86
EK 5. Hesperidin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	87
EK 6. Hesperidin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	87
EK 7. Kumarin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	88
EK 8. Kumarin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	88
EK 9. 7,3',4'-trihidroksiizoflavon standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	89
EK 10. 7,3',4'-trihidroksiizoflavon standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi.....	89
EK 11. 7,8,4'-trihidroksiizoflavon standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	90
EK 12. 7,8,4'-trihidroksiizoflavon standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	90
EK 13. Daidzein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	91
EK 14. Daidzein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	91
EK 15. Glisitein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	92
EK 16. Glisitein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi.....	92
EK 17. Naringin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	93
EK 18. Naringin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	93

EK 19. Ferulik asit standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	94
EK 20. Ferulik asit standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	94
EK 21. Genistin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	95
EK 22. Genistin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	95
EK 23. Genistein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü	96
EK 24. Genistin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi	96
EK 25. Fenolik bileşik standartlarına ait toplam iyon kromatogramı.....	97
EK 26. Soya hücre ekstraktında belirlenen fenolik bileşiklerin toplam iyon kromatogramı.....	98
EK 27. Aktin Beta genine ait amplifikasyon eğrileri.....	99
EK 28. TYR genine ait amplifikasyon eğrileri.....	99
EK 29. TYRP1 genine ait amplifikasyon eğrileri.....	100
EK 30. TYRP2 genine ait amplifikasyon eğriler.....	100
EK 31. MITF genine ait amplifikasyon eğrileri.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Melanozom biyogenezi ve melaninin keratinositlere transferi (Kierszenbaum ve Tres, 2016'dan değiştirilmiştir).	4
Şekil 2.2: Açık ve koyu pigmentli deri tiplerinde insan deri yapısının şematik gösterimi (Mohiuddin 2019'dan Türkçeleştirilmiştir). En üsten alta: SC, stratum corneum, G, stratum granulosum, S, stratum spinosum, B, stratum basale, BM, bazal membran, D, dermis, Hücre tipleri: K, keratinosit, M, melanosit, F, fibroblast; oval yapılar, melanin granülleri.	5
Şekil 2.3: Ömelanin ve feomelanin sentez basamakları (Masum ve diğ., 2019'dan değiştirilmiştir).	6
Şekil 2.4: Melanogenez yolları (Pillaiyar ve diğ., 2018'den değiştirilmiştir).	8
Şekil 2.5: Majör flavonoidlerin iskelet yapısı (Smith ve Meyskens, 2015'ten değiştirilmiştir).	12
Şekil 4.1: Soya tohumlarından gelişen <i>in vitro</i> fidelerin görüntüsü.	44
Şekil 4.2: <i>In vitro</i> soya fidelerinin gövde eksplantlarından G8 besin ortamında elde edilen kallusların görüntüsü. a.) 14 günlük kalluslar b.) 60 günlük kalluslar.	47
Şekil 4.3: Soya hücre süspansiyonlarının görüntüsü. a.) Soya gövde eksplantlarından elde edilen süspansiyonların inkübasyonu, b.) Soya süspansiyon hücrelerinin FDA boyaması ile floresans mikroskop görüntüleri (40x).	48
Şekil 4.4: Gallik asit konsantrasyonlarına bağlı elde edilen standart eğri grafiği.	48
Şekil 4.5: Soya hücre ekstraktının içerdiği gallik asit eşdeğeri toplam fenolik bileşik miktarı.	49
Şekil 4.6: Standart fenolik bileşiklerin toplam iyon kromatogramı.	50
Şekil 4.7: Soya hücre ekstraktının toplam iyon kromatogramı.	51
Şekil 4.8: Soya hücre ekstraktının B16-F10 fare melanoma hücrelerinin canlılığına etkisi (*: Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, p<0,001).	52
Şekil 4.9: Soya hücre ekstraktının CRL-2076 insan normal fibroblast hücrelerinin canlılığına etkisi.	53
Şekil 4.10: İnkübasyon süreleri tamamlanmış α -MSH uyarımı yapılan (Alfa-MSH grubu) ve yapılmayan hücrelerin (kontrol grubu) pelletlerinin görüntüsü.	54

Şekil 4.11: Yalnızca α -MSH uyarımı yapılan (Alfa-MSH grubu) hücrelerin ve α -MSH uyarımından sonra soya hücre ekstraktının 0,3 mg/ml konsantrasyonu ile inkübe edilen hücrelerin pellet görüntüsü.	54
Şekil 4.12: Yalnızca α -MSH uyarımı yapılan (Alfa-MSH grubu) hücrelerin ve α -MSH uyarımından sonra soya hücre ekstraktının 1 mg/ml konsantrasyonu ile inkübe edilen hücrelerin pellet görüntüsü.	55
Şekil 4.13: Soya hücre ekstrakt ve kojik asit konsantrasyonlarının B16-F10 fare melanoma hücrelerinin melanin içeriğine etkisi (*: Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p<0,001$).	56
Şekil 4.14: Soya hücre ekstraktı ve kojik asit konsantrasyonlarının B16-F10 fare melanoma hücrelerinde tirozinaz aktiviteye etkisi (*: Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p<0,001$).	57
Şekil 4.15: α -MSH uygulanmayan (kontrol grubu) ve α -MSH ile uyarılan (Alfa-MSH grubu) hücrelerinin RNA izolasyonu öncesindeki medyum görüntüsü.	58
Şekil 4.16: α -MSH ile uyarılan (Alfa-MSH grubu) ve soya hücre ekstraktı (0,5 mg/ml ve 1 mg/ml) uygulanan hücrelerin RNA izolasyonu öncesindeki medyum görüntüsü.	58
Şekil 4.17: Soya hücre ekstraktının B16-F10 melanoma hücrelerinde TYR gen ifadesi üzerine etkisi	59
Şekil 4.18: Soya hücre ekstraktının B16-F10 melanoma hücrelerinde TYRP1 gen ifadesi üzerine etkisi.	60
Şekil 4.19: Soya hücre ekstraktının B16-F10 melanoma hücrelerinde TYRP2 gen ifadesi üzerine etkisi.	60
Şekil 4.20: Soya hücre ekstraktının B16-F10 melanoma hücrelerinde MITF gen ifadesi üzerine etkisi.	61
Şekil 4.21: Soya hücre ekstraktı ve kojik asit konsantrasyonlarının melanogenez ilişkili proteinlerin ifadesine etkisi.	62

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bitki hücre kültürü ile tıbbi bitkilerden elde edilen bazı fitokimyasallar (Güven ve Gürsul., 2014; Efferth, 2019).	17
Tablo 3.1: MS besiyeri bileşenleri	23
Tablo 3.2 Kallus uyarmında kullanılan besiyeri içerikleri	25
Tablo 3.3: LC-MS/MS cihazı ile analiz edilen fenolik bileşikler	29
Tablo 3.4: LC-MS/MS Analizlerinde Kullanılan HPLC ve MS koşulları	31
Tablo 3.5: cDNA sentezi için hazırlanan 2X RT Master karışımının bileşenleri	37
Tablo 3.6: cDNA sentezinde kullanılan termal döngü	37
Tablo 3.7: RT-qPCR Reaksiyonu Bileşenleri	38
Tablo 3.8: RT-qPCR termal döngüsü.....	39
Tablo 3.9: Protein örneklerinin hazırlanışı.....	41
Tablo 4.1: Farklı kombinasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında gözlenen kallus yanıtları.	45
Tablo 4.2: Fenolik bileşiklerin MRM geçişleri.	50
Tablo 4.3: LC-MS/MS analizleri sonucunda soya hücre ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (N.D: madde bulunamadı).	51

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde değeri
g	: gram
L	: Litre
mg	: miligram
nM	: Nanomolar
°C	: Santrigrat derece
ppb	: µg gram çözünen /litre çözelti
V	: Volt
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
2,4 D	: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
AC	: Adenilat siklat
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AP-3	: Adaptör protein 3
BAP	: 6-Benzilaminopürin
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albumin
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
cDNA	: Komplementer DNA
CREB	: cAMP-yanıt element bağlanma proteini
DHI	: Dihidroksiindol
DHICA	: İndol 5,6 kinon 2-karboksilik asit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOPA	: 3,4-dihidroksifenilalanin

ERK	: Ekstraselüler sinyal-regüle kinaz
FBS	: Fetal sıgır serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDA	: Floresin diasetat
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GMP	: İyi üretim uygulamaları
GSKβ	: Glikojen sentaz kinaz 3 β
IMDM	: Iscove's Modified Dulbecco's Medium
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
LEF1	: Lenfosit enhansır faktör-1
MAPK	: Mitojen-aktif protein kinaz
MC1R	: Melanokortin 1 reseptör
MITF	: Mikrofitamia-ilişkili transkripsiyon faktör
MRM	: Çoklu Reaksiyon Görüntüleme
MS	: Murashige and Skoog medium
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5difenil tetrazolyum bromid
NAA	: Naftelenasetik asit
OD	: Optikal yoğunluk
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
PCV	: Sıkıştırılmış hücre hacmi
PI3K	: Fosfotidilinositol-3 kinaz
PKA	: Protein kinaz A
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS PAGE	: SDS Poliakrilamit Jel Elektroforezi
TCF	: T-hücre faktör
TYR	: Tirozinaz
TYRP1	: Tirozinaz ilişkili protein 1
TYRP2	: Tirozinaz ilişkili protein 2
UVR	: Ultraviyole radyasyon
α-MSH	: α -melanin stimüle edici hormon
β-MSH	: β -melanin stimüle edici hormon

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Glycine max HÜCRE SÜSPANSİYON EKSTRAKTININ B16-F10 MELANOMA
HÜCRELERİ ÜZERİNDE ANTI-MELANOGENEZ AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ

Yıldız BODURLAR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr.Mahmut ÇALIŞKAN

Bu çalışmada izoflavonoidler ve diğer fenolik bileşikler içeren soya hücre kültürü ekstraktının melanogenez sürecine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla soya tohumlarından *in vitro* fideler, *in vitro* fidelerden kallus ve süspansiyon kültürleri elde edilmiştir. Soya hücre kültüründen elde edilen ekstraktta bulunan toplam fenolik içeriği Folin Ciocalteu yöntemiyle, izoflavonoidler ve diğer fenolik bileşikler kromatografik olarak LC-MS/MS analizleri ile belirlenmiştir. Soya hücre kültürü ekstraktının *in vitro* sitotoksitesi fare melanoma hücreleri (B16-F10) ve insan normal fibroblast hücreleri (CRL-2076) üzerinde değerlendirilmiştir. Soya hücre kültürü ekstraktının doza bağlı olarak, anlamlı oranda ($p<0,001$) B16-F10 melanoma hücrelerinde melanin içeriğini azalttığı ve tirozinaz aktiviteyi baskıladığı bulunmuştur. Soya hücre kültürü ekstraktının, MITF transkripsiyon faktörünün ifadesini baskılayarak TYR, TYRP1 ve TYRP2 enzimlerinin ifadesini baskıladığı hem gen hem de protein düzeyinde ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar soya hücre ekstraktının etkili bir cilt beyazlatıcı ajan olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Haziran 2020, 117 sayfa.

Anahtar kelimeler: Soya, İzoflavonoid, Melanogenez, Anti-tirozinaz, B16-F10

SUMMARY

Ph.D. THESIS

DETERMINATION of ANTI-MELANOGENESIS ACTIVITY of *GLYCINE MAX*
CELL SUSPENSION EXTRACT on B16-F10 MELANOMA CELLS

Yıldız BODURLAR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr.Mahmut ÇALIŞKAN

In this study, it was aimed to determine the effect of soybean cell culture extract containing isoflavonoids and other phenolic compounds on the process of melanogenesis. For this purpose, firstly *in vitro* seedlings from soybean seeds were obtained and then callus and cell suspension cultures were prepared from them for further analysis. The total phenolic content in the extract of soybean cell culture was determined by Folin Ciocalteu method and isoflavonoids and the other phenolics were determined chromatographically by LC-MS/MS analysis. *In vitro* cytotoxicity of soybean cell culture extract was evaluated on mouse melanoma cells (B16-F10) and human normal fibroblast cells (CRL-2076). It was found that the soybean cell culture extract significantly ($p<0,001$) decreased melanin content and suppressed tyrosinase activity on melanoma cells in a dose dependent manner. It was revealed that at both gene and protein levels soybean cell culture extract suppresses the expression of TYR, TYRP1 and TYRP2 enzymes by suppressing the expression of the MITF transcription factor. The results indicate that soybean cell culture extract has the potential to be an effective skin whitening agent.

June 2020,117 pages.

Keywords: Soybean, Isoflavonoid, Melanogenesis, Anti-tyrosinase, B16-F10

1. GİRİŞ

Deri, keratinositler ile çevrili melanositlerden oluşan ve kapalı bir parakrin sistem ile düzenlenen epidermal birimlere sahiptir (Seiberg 2001). Melanositler, melanogenez adı verilen melanin üretim ve dağıtımından sorumludur. Melanin, deri, saç ve göz renginin birincil belirleyicisidir (Lee ve Cha, 2019). Melanogenezin enzimatik olarak, tirozinaz (TYR), tirozinaz-ilişkili protein-1 (TRP-1, TYRP1) ve dopakrom totomeraz olarak da adlandırılan tirozinaz ilişkili protein-2 (TRP-2, TYRP2) olmak üzere 3 anahtar düzenleyicisi bulunur (Pillaiyar ve diğ., 2018). Pigmentasyondan sorumlu tirozinaz ailesi genlerinin (TYR, TRP-1 ve TRP-2) transkripsiyonel olarak düzenlenmesinden ise mikrofalmi ilişkili transkripsiyon faktörü (MITF) sorumludur (Zhou ve diğ., 2012).

Melaninin temel görevi, deriyi zararlı ultraviyole radyasyona (UVR) ve çevresel kirleticilere, toksik ilaçlara ve kimyasallar gibi farklı kaynaklardan gelen streslere karşı korumaktır. Melanin derinin korunmasında kritik olmasına rağmen, melaninin anormal üretimi hipopigmentasyon ve hiperpigmentasyon gibi pigmenter rahatsızlıklara yol açabilmektedir. Vitiligo ve albinizm durumlarında hipopigmentasyon gözlenirken, hiperpigmentasyon melazma, post inflamatuvar melanoderma, güneş lekeleri, çil ve yaşlılık lekeleri gibi dermatolojik problemlere sebep olmaktadır (Kim ve Ma, 2013; Pillaiyar ve diğ., 2018; Phacharapiyangkul ve diğ., 2019).

Hiperpigmentasyon hastalıklarını tedavi etmek amacıyla kojik asit, arbutin, hidrokinon ve askorbik asit gibi tirozinaz baskılayıcılar ve biyolojik indirgeyiciler geliştirilmiştir. Buna rağmen sitotoksikite, oksijen ve su varlığında düşük stabilite, deri iritasyonu ve dermatit gibi yan etkilerinden dolayı tirozinazı baskılayabilen cilt beyazlatma ajanlarının kullanımları sınırlanmıştır (Chung ve diğ., 2018). Bu sebeple daha etkili ve daha az yan etkiye sahip doğal bileşikler içeren alternatif yeni cilt beyazlatma ajanlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Kim ve Ma, 2014).

Son zamanlarda, estetik görünüşün dışında sağlık için faydaları da olan doğal bileşenlere talebin artmasından dolayı, bitki ekstraktları kozmetikler için popüler aktif hammaddeler haline gelmiştir (Georgiev ve diğ., 2018). Diğer yandan, yavaş büyüme, sezona bağlı hasat, bitkiden

bitkiye hasattan hasata aktif bileşen konsantrasyonunun farklılaşması bitkilerin kozmetiklerdeki kullanımını sınırlandırmaktadır. Bitki hücre kültürü teknikleri bitki kullanımına bağlı bu önemli problemlerin üstesinden gelinmesine yardımcı olmaktadır (Trehan ve diğ., 2017). Bitki hücre kültürlerinin, kontrollü şartlar altında, belirli kalite ve miktarda üretim imkanı sunma, mevsimden bağımsız üretim, düşük ekosistem etkisi ve su ihtiyacı, karbon ayak izini azaltma, pestisit ve herbisit gerekliliği olmama gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Eibl ve diğ., 2018). Günümüzde, tüketicilerin etkili ve güvenli doğal ürünlere ilgisinin artmasıyla birlikte, son on yılda bitki hücre kültürü teknolojisi ile üretilen yüksek kaliteli biyoaktif fitokimyasalların kozmesötik piyasasındaki mevcudiyetleri giderek artmaktadır (Georgiev ve diğ., 2018).

Bitki hücre kültürü teknolojisi, bitkilerde bulunan fenolik bileşikler gibi fitokimyasalların yüksek verimlerde elde edilmesine imkan tanımaktadır (Trehan ve diğ., 2017). Fenoliklerin birçok biyolojik aktivitesi ile birlikte, anti tirozinaz ve melanin üretimini azaltıcı aktiviteleri de bildirilmiştir (Dzialo ve diğ., 2016). Tirozinaz aktivitesi ve melanogenez üzerine etkileri en iyi çalışılmış fenolik bileşikler ise flavonoidler olmuştur (Masum ve diğ., 2019). Soyaada bulunan birçok izoflavonoidin ve diğer fenolik bileşiklerin etkili anti-tirozinaz ve melanin sentezi baskılama aktiviteleri yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Chang ve diğ., 2005; Park ve diğ., 2010; Lee ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2012; Loizzo ve diğ., 2012; Lee ve diğ., 2015). Soya fenolik bileşikleri ile yapılan bu çalışmalara rağmen, soya bitki ekstraktının veya soya hücre ekstraktının anti-tirozinaz ve melanogenez üzerine etkileri henüz ortaya konulmamıştır.

Bu tezde, soya hücre kültüründen elde edilen ekstraktın B16-F10 melanoma hücreleri üzerindeki anti-melanogenez etkisi araştırılmıştır. Çalışmada soya hücre ekstraktının içerdiği tüm fenolik bileşiklerin melanogenez üzerine sinerjik etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, soya hücre ekstraktının toplam fenolik bileşik miktarı Folin Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiş ve fenolik bileşik içeriği LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Ayrıca, soya hücre ekstraktının *in vitro* melanin içeriğine etkisi ve anti-tirozinaz aktivitesi B16-F10 melanoma hücrelerinde araştırılmıştır. Bunların yanında, soya hücre ekstraktının melanogenez üzerine etkisi gen düzeyinde RT-qPCR analizleri ile protein düzeyinde ise Western Blot analizleri ile değerlendirilmiştir. Bu tez çalışması ile soya hücre ekstraktının içerdiği fenolik bileşiklerin sinerjik etkilerinin *in vitro* düzeyde melanin sentezi üzerine olan etkisi ortaya konmuştur.

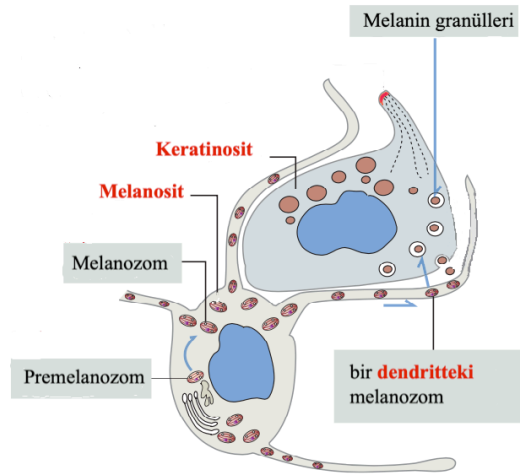
2. GENEL KISIMLAR

2.1. MELANOGENEZ

Deri, keratinositlerle çevrelenmiş bir melanositten oluşan ve kapalı bir parakrin sistem tarafından düzenlenen epidermal birimlere sahiptir. Nöral kristadan göç eden öncü hücrelerden olan melanoblastlardan köken alan melanositler, melanogenez adı verilen melanin üretim ve dağıtım sürecinden sorumludurlar. Yuvarlak hücre gövdesi deri epidermisinin startum bazale tabakasında dağınık halde bulunan melanositler, uzantıları sayesinde stratum spinozum keratinositlerine kadar uzanırlar. Bir melanosit uzantıları aracılığıyla, epidermal-melanin birimi oluşturmak için yaklaşık 36 adet keratinosit ile iletişim kurar (Kierszenbaum ve Tres, 2016; Lee ve Cha, 2019).

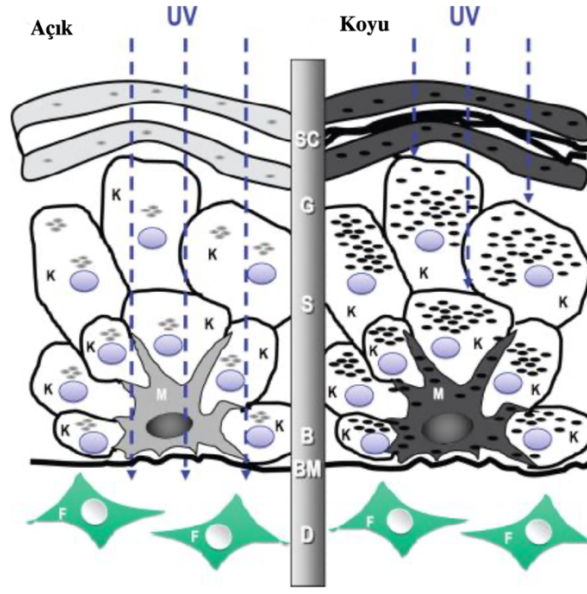
İnsan deri, saç ve göz rengini belirleyen melanin, melanozom adı verilen melanositlere özgü organellerin içinde sentezlenir. Melanositler dendritleri sayesinde melanin içeren melanozomları, keratinositlere transfer ederek deri altında yayma kabiliyetine sahiptir. Melanozomlar, endozomal-lizozomal sistemden köken alan özelleşmiş pigment içeren organellerdir ve olgun melanozom oluşana kadar 4 olgunlaşma evresi ile karakterize edilirler: 1. evre melanozom veya premelanozomlar, düz endoplazmik retikulumdan orijinlenen küresel organellerdir. Premelanozomlar, şekilsiz matriks ve gp100 adlı bir transmembran protein içerirler. gp100 proteini, internal fibriler matriks oluşturmak için proteolitik olarak ayrılır ve bu ayrılma da oval şekilli II. evre melanozomlarının oluşması ile sonuçlanır. III. evre melanozom, melanin depolamanın başlangıcı olarak karakterize edilirken IV. evre melanozomların (olgun melanozom) içi tamamen melanin ile doludur.

Melanozomlar, sitoplazmik uzantılar aracılığıyla stratum spinozumdaki komşu keratinositlere aktarılır. Melanin granülleri, komşu keratinositler tarafından hücre içine alınır. Melaninin en önemli görevi organizmayı iyonize olmayan ultraviyole ışınlarının zararlı etkilerinden korumaktır (Kierszenbaum ve Tres, 2016; Levin ve Albert 2010; Kim ve diğ., 2013; Choi ve Shin, 2016) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Melanozom biyogenezi ve melaninin keratinositlere transferi (Kierszenbaum ve Tres, 2016'dan değiştirilmiştir).

Memelilerde, L-dopakrom'dan sentezlenen kahverengimsi siyah ömelanin ve melanozomlarda sülfidril bileşenlerinin varlığına bağlı olarak sentezlenen kırmızımsı sarı feomelanin olmak üzere iki çeşit melanin tipi bulunur (Mello ve diğ., 2016). Deri, saç ve göz rengi, bu iki tip melanin pigmenti arasındaki oranı ile belirlenir. Melanin pigmentinin miktarı ve ömelanin-feomelanin oranı, beyazdan (melanin pigment eksikliği) siyaha (artmış melanin yoğunluğu) kadar farklı deri renklerinin oluşumunda önemlidir (Şekil 2.2, Maranduca ve diğ., 2019). Eğer epidermal melanositler tarafından üretilen feomelaninin miktarı ömelanin miktarından fazla ise cilt daha açık renklidir ve güneş yanıklarına karşı daha fazla hassasiyete sahiptir. Bunun yanında daha fazla miktarda feomelanin içeren ciltler, güneş ultraviyole radyasyonuna maruziyetinde, hücresel lezyona ve karsinojenik sürecin başlamasına sebep olan reaktif oksijen türlerini daha fazla miktarda üretir (Okazaki ve diğ., 2015; Lupu ve diğ., 2015).

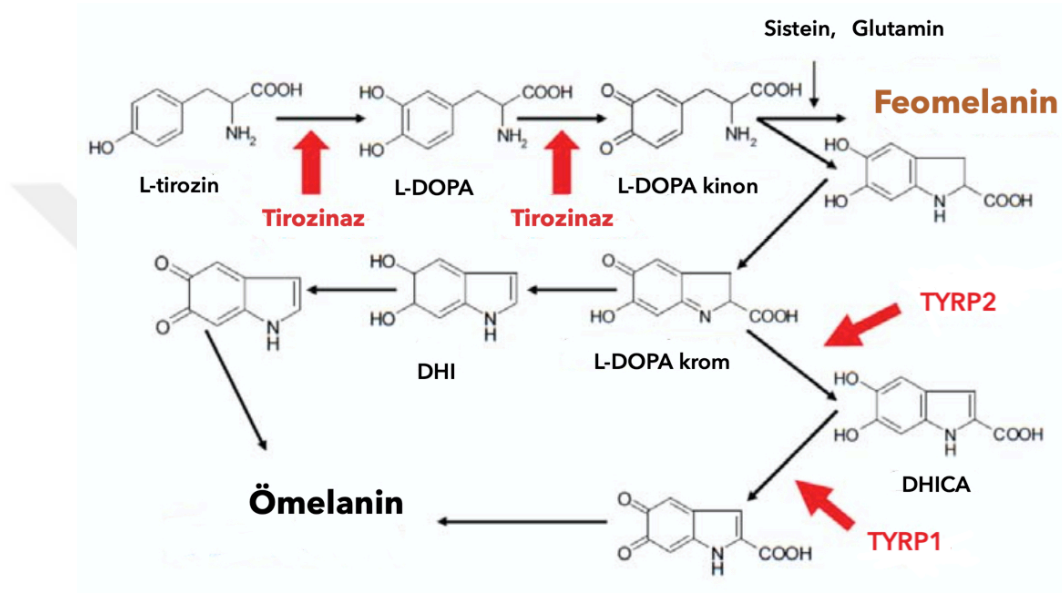


Şekil 2.2: Açık ve koyu pigmentli deri tiplerinde insan deri yapısının şematik gösterimi (Mohiuddin 2019'dan Türkçeleştirilmiştir). En üstten alta: SC, stratum corneum, G, stratum granulosum, S, stratum spinosum, B, stratum basale, BM, bazal membran, D, dermis, Hücre tipleri: K, keratinosit, M, melanosit, F, fibroblast; oval yapılar, melanin granülleri.

Melanozomlar, her iki melanin tipinin (feomelanin ve ömelanin) sentezi için de mutlaka gerekli olan Tirozinaz (TYR), Tirozinaz ilişkili protein-1 (TRP1 veya TYRP1), Tirozinaz ilişkili protein-2 (TRP2, TYRP2 veya DOPA krom totomeraz) enzimlerini içerirler. Bu enzimler AP-3 (adaptör protein kompleks) ve BLOC-1 (lizozomal organeller kompleksi-1'in biyogenez) kompleksi yoluyla melanozomlara ulaştırılırlar. İlk enzim olan TYR, melanogenezde kritik ve sınırlandırıcı basamak olan Tirozin'in 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA)'e hidroksilasyonu ve DOPA'nın oksidasyon ile DOPA kinon'a dönüşümünden sorumludur (Kim ve diğ., 2016; Serre ve diğ., 2018).

DOPA kinon, ömelanogenez ve feomelanogenez arasında dallanma noktasıdır: Ömelanin yolağında; sistein veya glutatyon gibi tiyollerin yokluğunda DOPA kinon, oto-oksidasyon yoluyla DOPA krom'a dönüştürülür. TYRP2, DOPA krom totomeraz olarak etki eder ve DOPA krom'un indol 5,6 kinon 2-korboksilik asit (DHICA)'e yeniden düzenlenmesini katalizler. TYRP1 ise DHICA'nın ömelanine oksidasyonunu katalize eder. TYRP2'nin yokluğunda ise DOPA krom melanine polimerize olan dihidroksiindol (DHI)'e dekarboksile olur (DHI-melanin DHICA-içeren melaninden daha koyu renklidir). TYRP-1 ve TYRP-2 aynı zamanda TYR'ın aktivitesini stabilize etme ve arttırmada da görev alır.

Feomelanin yolağında; sistein veya glutatyon varlığında dopakinonlar tiyol-içeren sistein veya glutatyon ile konjuge olarak sisteinil DOPA veya glutatyonil DOPA'ya dönüşümü ile feomelanini oluşturur (Vachtenheim ve Borovansky, 2010; Kim ve diğ., 2013; Yao ve diğ., 2015; Alam ve diğ., 2017; Pillaiyar ve diğ., 2018). Ömelanin ve feomelanin biyosentez basamakları Şekil 2.3'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Ömelanin ve feomelanin sentez basamakları (Masum ve diğ., 2019'dan değiştirilmiştir).

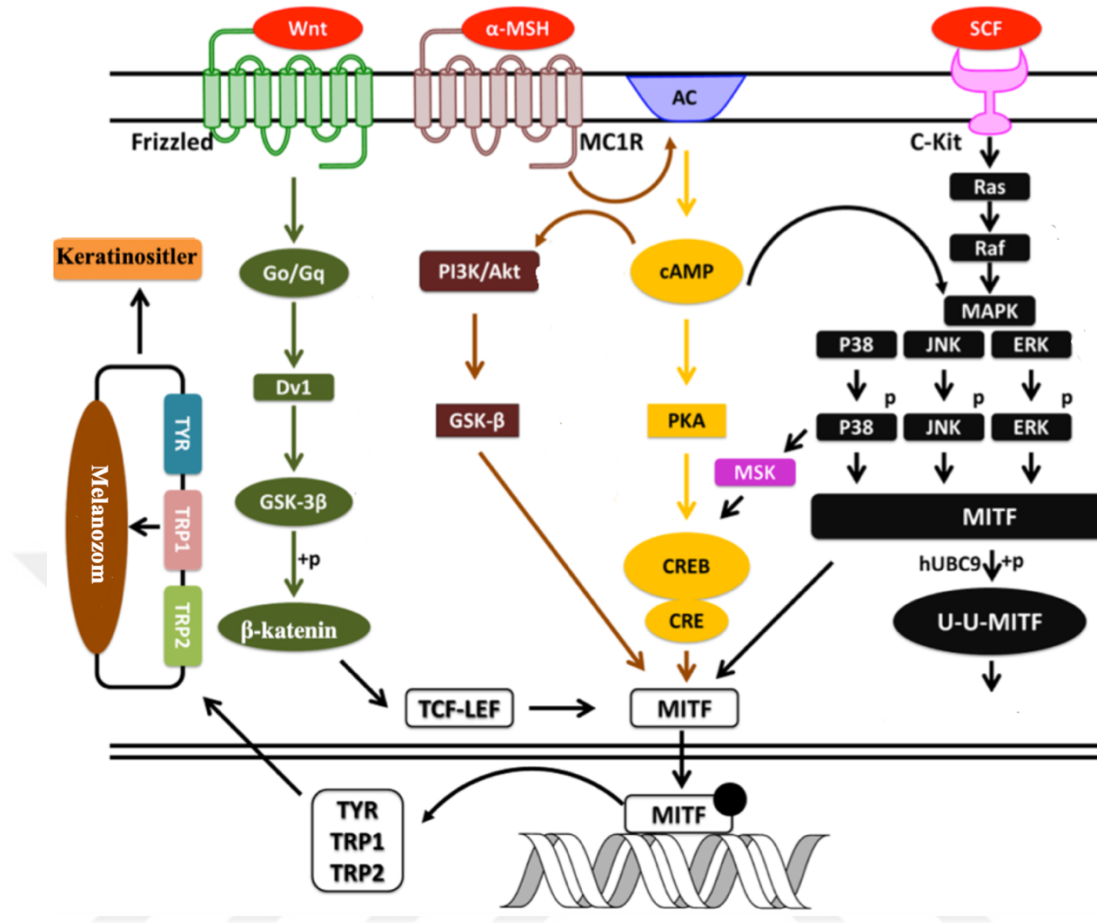
2.1.1. Melanogenezi Düzenleyen Sinyal Yolakları

Melanogenezi düzenleyen birkaç tane sinyal yolağı bilinmektedir. Bunlardan biri siklik adenozin monofosfat/protein kinaz A (cAMP/PKA) aracılı sinyal yolağıdır. Melanogenez, hormonal olarak α -melanin stimüle edici hormon (α -MSH) tarafından cAMP/PKA sinyal yolağı aracılığıyla uyarılır. α -MSH, melanokortin 1 reseptör (MC1R)'üne bağlandığında cAMP üretimi için adenilat siklaz (AC)'ı aktive eder ve fosforilasyon ile protein kinaz A (PKA) aktive olur. Fosforile PKA, cAMP-yanıt element bağlanma (CREB) proteinini fosforile ederek aktive eder. Bunun üzerine MITF (mikrofitamia-ilişkili transkripsiyon faktör) geninin transkripsiyonu uyarılır. Son olarak, MITF, tirozinaz geninin promoter'ındaki M-kutusuyla bağlanarak TYR, TYRP1 ve TYRP2 genlerini düzenler (Şekil 2.3.). MITF, etkili bir şekilde melanogenez-ilişkili enzimleri (TYR, TYRP-1, TYRP-2) aktive eder ve melanogenezi uyarır (Zhou ve diğ., 2012; Chung ve diğ., 2018; Serre ve diğ., 2018).

α -MSH memeli derisinde güçlü bir melanogenez uyarıcı olmasına rağmen β -MSH ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) da cAMP/PKA aracılı yolak vasıtasıyla melanogenezi uyarır (Vachtenheim ve Borovansky, 2010; Lee ve diğ., 2018; Masum ve diğ., 2019). cAMP aynı zamanda fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K)'ın baskılanması yoluyla MITF'in post-translasyonel modifikasyonunu etkiler. PI3K'ın baskılanması Akt fosforilasyonunun azalmasına neden olur ve bunun sonucunda GSK β (glikojen sentaz kinaz 3 β) seviyesini düşürerek p-GSK β aktivitesini uyarır. Aktive olan GSK β , MITF'yi fosforiller ve bu da MITF'nin upregülasyonu yoluyla melanogenezin uyarılmasına sebep olur (Masum ve diğ., 2019).

Wnt sinyal yolağı ise MITF gen ekspresyonunu intraselüler β -katenin seviyesini arttırarak melanogenezi düzenleyen yolaklardan biridir. Wnt'nin G-protein kaplı reseptör (Frizzled)'e bağlanması yoluyla Wnt yolağının aktivasyonu GSK-3 β 'yı negatif regüle eder. Bu da sitoplazmik β -katenin'in birikmesine sebep olur. β -katenin çekirdeğe transloke olur ve melanogenez uyarımını sağlayan MITF geninin ekspresyonunu upregüle etmek için T-hücre faktör (TCF) ve lenfosit enhansör faktör-1 (LEF)'ü ile kompleks oluşturur. Bunun sonucunda MITF ekspresyonu arttırılarak melanogenez uyarılır (Uyen ve Diğ., 2008; Chao ve diğ., 2009).

Melanin sentezi sinyal yolaklarındaki önemli faktörlerden biri de Mitojen-aktif protein kinaz (MAPK)'lardır. Diğer sinyal yolaklarının aksine ekstraselüler sinyal-regüle kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p 38 MAPK, MITF ubiquitinizasyonu ve degradasyonu yoluyla melanogenezi regüle eder. Bu sebeple MAPK sinyal yolağı, melanin üretiminin baskılanmasında önemli bir rol oynar (Alam ve diğ. 2017; Chung ve diğ., 2018; Karunarathne ve diğ., 2019). Melanin sentezinde rol oynayan sinyal yolakları Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Melanogenez yolakları (Pillaiyar ve diğ., 2018'den değiştirilmiştir).

2.1.2. Hiperpigmentasyon ve Tedavi Yaklaşımları

Melanositlerin sentezlediği melanin miktarı genetik olarak belirlenir ve etnik kökene bağlıdır. Buna rağmen sentezlenen melanin miktarı intrinsik ve ekstrinsik faktörlerin de etkisi altındadır. İntrinsik faktörler kategorisi, melanositi çevreleyen hücreler olan keratinositler, fibroblastlar ve endokrin hücreler tarafından sentezlenen molekülleri içerir (Videira ve diğ., 2013). Ultraviyole radyasyon ve farklı kimyasal ürünler ekstrinsik faktörleri temsil etmekte olup kütanoz nöroendokrin sistemin kontrolü altındadırlar (Slominski ve diğ., 2012).

Deri renginde koyulaşmaya neden olan hiperpigmentasyon UV ışınlarına maruz kalma, bazı ilaçların kullanımında ya da bazı hastalıkların sonucunda ortaya çıkabilmektedir. Bunların yanında travma, kimyasal soyma, lazer uygulamaları, akne ve bazı deri hastalıklarına yanıtta oluşabilmektedir (Yapar, 2017).

İnsan derisinde, güneşin ultraviyole radyasyonuna karşı ana koruma mekanizması olan melanin pigmenti, aşırı miktarda üretildiğinde melazma, kırışıklık, leke gibi hiperpigmentasyon problemlerine yol açabilmektedir (Jeniffer ve diğ., 2012; Kim ve diğ., 2013). Bu sebeple melanogenezin düzenlenmesi, aşırı deri pigmentasyonu tedavisinde önemli bir stratejidir ve cilt beyazlatıcı olarak anılan pigmentasyon azaltıcı ajanlara olan ilgi giderek artmaktadır (Chung ve diğ., 2018; Karunarathne ve diğ., 2019). Dünya nüfusunun yaklaşık olarak %15'i cilt beyazlatma ürünü kullanmaktadır ve cilt beyazlatma ajanları piyasasının 2020'ye kadar yaklaşık olarak 23 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Pillaiyar ve diğ., 2018).

Pigmentasyon azaltıcı ajanlar, tirozinaz transkripsiyonunu baskılama, tirozinaz enzimini baskılama, epidermal yenilenmeyi hızlandırma, melanozom transferini baskılama, anti-inflamatuar ve serbest radikalleri süpürücü etki yoluyla ile etki göstermektedir (Couteau ve Coiffard, 2016). Melanogenezin anahtar enzimi olan tirozinaz, hiperpigmentasyonunun baskılanmasında ilk hedefidir. Melanin biyosentezinin temel sınırlandırıcı enzimi olan tirozinazı hedefleyen hem sentetik hem de doğal kaynaklardan birçok pigmentasyon giderici ajan geliştirilmiştir. Ancak bunların pek çoğunun zararlı yan etkilerinin ve spesifik dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir (Karunarathne ve diğ., 2019; Masum ve diğ., 2019).

Hidrokinon, belli aromatik bileşiklerin oksidasyon ürünü olup 1960'lardan sonra depigmentasyon amacıyla kullanılmaya başlanmıştır ve şimdiye kadar en çok kullanılan ajanlardan biri olmuştur. Hidrokinonun, tirozinaz sentezini baskılama, serbest radikal üretimi yoluyla melanositlerin yıkımı, melanozomlar ile etkileşim mekanizmaları ile etki ettiği bildirilmiştir. Klinik olarak %2 hidrokinon, cilt beyazlatıcılar için standart olarak kabul edilmiştir. Ancak topikal olarak %2-5 konsantrasyon aralığında kullanıldığında temas dermatiti, post inflammatuar pigmentasyon, okronozis ve tırnakların renksizleşmesi gibi istenmeyen etkilere sebep olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda memeli hücrelerinde mutajenite, melanositlerde sitotoksikite gibi etkileri de ortaya konmuştur. Bu olumsuz etkilerinden dolayı kozmetiklerde kullanımı Avrupa'da 2000 yılında yasaklanmıştır. Bunun yanında deri kanseri potansiyeli taşımasından dolayı kullanımı FDA tarafından 2006 yılında yasaklanmıştır (Chan ve diğ., 2016; Couteau ve Coiffard, 2016; Masum ve diğ., 2019).

Retinoik asit (A vitamini, tretinoin), bir yandan tirozinazı baskılayarak bir yandan da keratinositlerdeki pigmentleri ayırarak melanogenez sürecine direkt olarak müdahale

etmektedir. Aynı zamanda epidermal yenilenmeyi de hızlandırma etkisine sahiptir. Buna rağmen eritema ve deskuamasyon (deri soyulması) gibi istenmeyen etkileri gözlenmiştir. Bunun yanında retinoik asitin teratojenik etkisi net bir şekilde kanıtlanmıştır. Bu nedenlerle Avrupa ülkelerinde retinoik asit'in kullanımı yasaklanmıştır (Burger ve diğ., 2016; Couteau ve Coiffard, 2016).

Kojik asit (5-hidroksi-2- hidroksimetil-4H-piran-4-on) *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi mantar türlerinin metabolik ürünüdür. Bakır şelatlama yoluyla tirozinazı inaktive etmektedir. Buna rağmen kojik asitin alerjik reaksiyonlara, deri iritasyonuna sebep olduğu ve klinik çalışmalarda az miktarda etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda kojik asitin yüksek dozlarda, karaciğer ve tiroit tümörü geliştirme potansiyelinden dolayı İsviçre gibi bazı ülkelerde kullanımı yasaklanmıştır (Choi ve diğ., 2016; Lin ve diğ., 2018; Masum ve diğ., 2019).

Arbutin, dünya çapında cilt-beyazlatma ve pigmentasyon giderici olarak en çok reçete edilen ajanlardan biridir. Hidrokinonun doğal olarak oluşan b-D-glukoprinasit türevi olup ayıüzümü, yaban mersini, kıızılcık ve armut gibi bitki türlerinin yapraklarında bulunan bir bileşiktir. Arbutin, tirozinaz aktiviteyi ve melanozom olgunlaşmasını baskılayarak etki göstermektedir. Ancak çalışmalarda hiperpigmentasyonda arbutinin kojik asitten daha az etkili olduğu, düşük formülasyon stabilitesi ve zayıf deri penetrasyonu gösterdiği bildirilmiştir (Sarkar ve diğ., 2013; Masum ve diğ., 2019).

C vitamini doğal olarak oluşan bir antioksidan olup tirozinazın aktif bölgesindeki bakır iyonları ile etkileşime girmektedir. C vitamini, melanin oluşumunun farklı oksidatif basamaklarını indirgeyici ajan görevini üstlenerek melanogenezi baskılamaktadır. Meyve ve sebzelerde bulunan C vitamini, stabil olmaması ve deri penetrasyonunun düşük olmasından dolayı şüpheli etkinliğe sahiptir (Sarkar ve diğ., 2013).

Bugüne kadar birçok cilt beyazlatıcı aktiviteye sahip ajan geliştirmiş olmasına rağmen iritasyon, alerjik reaksiyonlar, stabilite, düşük etkinlik, sitotoksik etki, karsinojenite riski, düşük çözünürlük ve etkili olmayan deri absorpsiyonu gibi problemlerden dolayı güvenilir, etkili ve stabil cilt beyazlatıcı ajan gerekliliği halen devam etmektedir. Son yıllardaki 'doğaya dönüş trendi' cilt beyazlatıcı ajan arayışında da ilginin doğal ürünlere yönelmesine neden olmuştur (Lin ve diğ., 2008; Masum ve diğ., 2019).

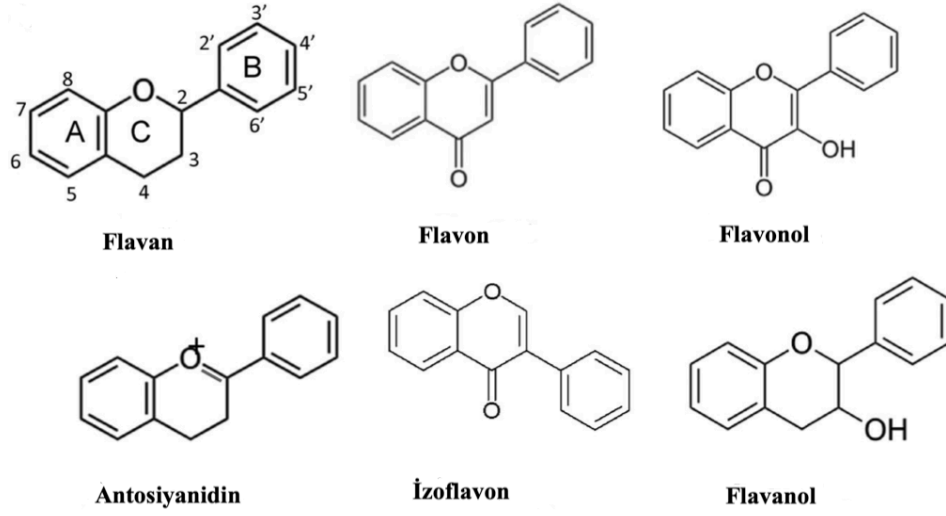
2.1.3. Fenolik Bileşikler ve Hiperpigmentasyona Etkileri

Bitki alemi, yüzbinlerce düşük moleküler ağırlıklı, sekonder metabolitler olarak bilinen yapısal olarak kompleks kimyasal bileşikleri taşıyan, yaklaşık 250,000 türü barındırmaktadır (Vijayakumar, 2018). Bitkiler, aminoasit, basit şekerler, nükleik asit ve lipid gibi bileşikleri içeren primer metabolitleri hücresel süreçler için üretirken, sekonder metabolitleri herbivora karşı caydırıcı olma gibi stres durumlarına yanıtta üretmektedir (Zwenger ve Basu, 2008).

Bitkisel kökenli fitokimyasallar veya sekonder metabolitler, kimyasal yapılarına bağlı olarak farklı şekillerde sınıflandırılabilir (Roopan ve Madhumitha, 2018). Bitki sekonder metabolitleri içerisinde en önemli gruplardan biri fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin ana iskeleti, hidrojenin daha aktif hidroksil, metil veya asetil ile değiştirildiği en az bir adet fenol halkası içermektedir. Bitkiler genellikle birden fazla fenolik halka içermektedir ve bu yüzden polifenol olarak adlandırılmaktadır (Dzialo ve diğ., 2016).

Fenolik bileşiklerin, cilt rahatsızlıklarından korunmada veya cilt rahatsızlık septomlarının azaltılmasında ve iyileşme sürelerinin kısaltılmasındaki potansiyel etkileri üzerine pek çok rapor yayınlanmıştır. Fenoliklerin antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal etkilerinin yanında hücre yenileyici, kolajen ve elastin sentezini uyarıcı, yanık ve yara iyileştirici, UV radyasyonundan koruyucu ve melanin üretimini azaltıcı gibi cilt üzerindeki pek çok aktivitesi yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Dzialo ve diğ., 2016). Doğada yaygın bir şekilde bulunan fenolik bileşikler, tirozinaz inhibitörlerinin en büyük grubudur. Tirozinaz aktivite ve melanogenez üzerine etkileri en iyi çalışılmış polifenoller ise flavonoidlerdir (Masum ve diğ., 2019).

Flavonoidler, çok çeşitli meyve, sebze ve tıbbi bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin en büyük ve en çok çalışılmış grubudur ve şimdiye kadar 5000'den fazla çeşit bileşik tanımlanmıştır. Flavonoidler, flavan ana iskelet yapısını taşıyan ve farklı yan grup modifikasyonlara sahip 5 ana gruba ayrılır: flavonlar, flavanoller, flavonoller, izoflavonlar ve antosiyanidinler. Flavan'ın ana yapısı A, B ve C halkası olmak üzere 3 halkadan oluşur (Şekil 2.5). Flavonoidlerdeki ana gruplar bu halkalardaki yan grupların modifikasyonu ile farklılaşırlar. Bileşiklerdeki yan gruplar, çok farklı aktiviteler kazandırdığından dolayı bileşiklerin fonksiyonlarında kritik rol oynarlar (Lin ve diğ., 2008; Smith ve Meyskens, 2016).



Şekil 2.5: Majör flavonoidlerin iskelet yapısı (Smith ve Meyskens, 2015'ten değiştirilmiştir).

İzoflavonoidler, soyada da bulunan önemli bir flavonoid sınıfıdır. Soya izoflavonoidlerinin birçok biyolojik aktivitesi; antioksidan aktiviteleri, antiinflamatuvar aktiviteleri, radyasyon-uyarımlı doku hasarına karşı koruyucu, glukoz/lipid metabolizmasını güçlendirerek adipositeyi azaltıcı, kalp damar hastalıkları riskini düşürücü ve kanser hücre büyümesini baskılayıcı etkileri bildirilmiştir (Waqas ve diğ., 2015; Hu ve diğ., 2019).

Soyada bulunan bazı izoflavonoidlerin ve diğer fenolik bileşiklerin anti tirozinaz ve melanin sentezi baskılama aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalar da yapılmıştır. Soyada bulunan izoflavonoidlerden olan 7,8,4'-trihidroksiizoflavon ve 7,3',4'-trihidroksiizoflavon'un sırasıyla 11,2 μM ve 5,23 μM dozlarının %50 oranında tirozinazı baskıladığı raporlanmıştır. Çalışmada aynı 7,8,4'-trihidroksiizoflavon ve 7,3',4'-trihidroksiizoflavon ve genistein bileşenlerinin hücresel melanin oluşumunu %50 baskılayan dozlarının sırasıyla 12,23 μM , 7,83 μM ve 57,83 μM olarak bulunduğu ve bu bileşenlerin arbutinden daha etkili melanin baskılama aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Park ve diğ., 2010).

Soyada bulunan bir izoflavon türevi olan 6,7,4' trihidroksiizoflavon'un güçlü anti tirozinaz aktivite gösterdiği yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Çalışmada 6,7,4' trihidroksiizoflavon'un tirozinaz baskılama IC_{50} değerinin 9,2 μM olduğu ve kojik asitten (IC_{50} : 54,4 μM) 6 kat daha fazla anti-tirozinaz aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Chang ve diğ., 2005). Gliseollin, soya bitkisinde stres koşulları altında üretilen bir izoflavonoid fitoaleksindir. Lee ve diğ., (2010)

gliseollin'in B16-F10 melanoma hücrelerinde α -MSH uyarımlı cAMP seviyesini etkili bir şekilde azalttığını, doza bağlı hücremelanin sentezini, TYR ve TRP-1 proteinlerinin ifadesini baskıladığını bildirmiştir. Soya izoflavonoidlerinden olan daidzein, glisitein ve daidzin'in anti-tirozinaz aktiviteye sahip olduğu ve tirozinaz baskılama IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 203, 218 ve 267 μ M olarak bulunduğu bildirilmiştir (Loizzo ve diğ., 2012). Soya izoflavonoidlerinden bir diğeri olan genistin'in 100 μ g/mL dozunun %53,3 oranında tirozinaz baskılama aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Wang ve diğ., 2012).

Turunçgil meyvelerinde bol miktarda bulunan hesperidin, soya gibi bazı farklı bitkilerde de bulunan bir flavonoidtir (Freitas ve diğ., 2019). Lee ve diğ., (2015) yaptıkları çalışmada, hesperidin ERK 1/2 fosforilasyonunu uyararak MITF degradasyonuna yol açtığı ve bu sayede melanogenik enzimleri ve melanin sentezini baskıladığını raporlamıştır. Ferulik asit, soyada major bulunan bir fenolik asittir (Prabakaran ve diğ., 2018). Ferulik asitin, tirozinaz enzimine bağlanarak tirozinaz aktiviteyi baskıladığı ve bu sayede B16-F10 melanoma hücrelerinde melanin sentezini etkili bir şekilde azalttığı belirlenmiştir (Maruyama ve diğ., 2018). Kumarinler, mantar tirozinazı etkili bir şekilde baskılayan fenolik bileşik grubudur. Kumarin dimer ve türevlerinin tirozinaz baskılama IC₅₀ değerlerinin 1,7-2,9 μ M aralığında olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Panzella ve Napolitano, 2019).

2.2. BİTKİ HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bitkiler, insanoğlunun keşfettiği tıbbi ve kozmetik özelliklere sahip en eski doğal bileşik kaynağıdır. Bugünlerde bile dünya genelindeki insanların %70-80'i temel sağlık bakım ihtiyaçlarını karşılamak için geleneksel bitki ilaçlarını kullanmaktadır. Sağlık alanında bitkilerin geniş kullanımı olmasına rağmen kozmetik alanında bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin aktif hammadde olarak kullanılma yüzdesi çok daha yüksektir (Georgiev ve diğ., 2018). Bitki ve bitki ekstraktları, nemlendirici, beyazlatıcı, antimikrobiyal, bronzlaştırıcı, renkli kozmetik, güneş koruyucu, radikal-süpürücü ve antioksidan gibi amaçlar için kozmetiklerde geniş kullanıma sahiptir (Schürch ve diğ., 2008; Ribeiro ve diğ., 2015).

Bitkilerin faydalarının bilinmesine rağmen kozmetikte kullanımlarını sınırlayan bazı önemli faktörler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri; mevsimsel nedenlerle bitkilerin elde edilememesi, yavaş büyüme hızı, sınırlı stok, bitki koruması, bitki yetiştirmedeki problemler, mevsimsel değişiklikler nedeniyle tutarsız kalite, bitkiden bitkiye hasattan hasata aktif madde

konsantrasyonundaki değişiklik, coğrafi farklılıklar, klon tipleri ve kirliliktir. Bitki kullanımına bağlı kozmetik üretimindeki bu kritik problemlerin üstesinden gelmek amacıyla bitki hücre kültürü teknikleri son dönemlerde kullanılmaya başlanmıştır (Schürch ve diğ., 2008; Trehan ve diğ., 2017; Kazmierski ve Roszkowski, 2019). Geleneksel bitki yetiştirme yöntemi ile kıyaslandığında bitki hücre kültürü teknolojisinin birçok önemli avantajı bulunmaktadır:

- I. Biyoaktif sekonder metabolitler, kontrollü çevrede dış faktörlerden (toprak kompozisyonu veya iklim) bağımsız şekilde üretilmektedir.
- II. Sekonder metabolitlerin üretimini etkileyen negatif biyolojik etkiler (mikroorganizmalar ve böcekler) elimine edilmektedir.
- III. Sekonder metabolitleri daha yüksek miktarda üreten kültürleri seçmeye imkan tanımaktadır.
- IV. Nadir bulunan ya da nesli tükenmekte olan bitkiler bile sekonder metabolitlerin üretimi için kültüre edilebilmektedir.
- V. Bitki hücre kültürü yenilenebilir ve çevre dostudur. Ekosisteme etkisi düşüktür, su kullanımını ve karbon ayak izini azaltmaktadır. Pestisit ve herbisite ihtiyaç bulunmamaktadır. Sıkı kontrole uygundur ve FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) üretim standartlarını karşılamaktadır.
- VI. Deneysel platformdan ticari olarak uygulanabilir endüstriyel boyuta başarılı bir şekilde taşınabilmektedir (Villarreal ve diğ., 2016; Eibl ve diğ., 2018; Efferth, 2019; Tripathi ve diğ., 2019).

Bitki hücre kültürü teknolojisi önemli avantajlar sağlamanın yanında birçok kompleks metot içermektedir. Bitki hücre kültürü, *in vitro* ortamda bitki dokusundan (kök, yaprak, gövde gibi) bir parçanın (eksplant) steril edilmesi ile başlamaktadır. Steril edilen bitki eksplantlarının mekanik olarak yaralanmasının ardından, uygun bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu besin ortamına alınmasından belirli bir süre sonra kallus oluşumu gözlenmektedir. Temelde bitkideki meristematik aktiviteyi uyatarak farklılaşmamış hücrelerin eldesi için yara oluşturulmaktadır. Bitki dokusu yaralanan bölgeyi tamir etmek amacıyla kallus adı verilen farklılaşmamış hücre yığınlarını oluşturmaktadır. Belirli periyotlarda oluşan kalluslar yeni besiyerine aktararak alt kültüre alınmaktadır ve böylece hücre hattının çoğalması sağlanmaktadır. Kallus kültürü, direkt ve indirekt organogenez, bitki rejenerasyonu, somatik

embriyogenez ve hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç noktasıdır (Toso ve diğ., 2009; Topçu ve Çölgeçen, 2015; Aktaş ve Çölgeçen, 2017).

Farklılaşmış bitki hücreleri ve kültüre edilmiş kallus hücreleri birbirinden oldukça farklıdır. Kallus hücreleri, yalnızca küçük vakuoller taşıyan ve fotosentez için gerekli kloroplastı içermeyen farklılaşmamış meristem hücrelerine benzemektedir. Kallus kültürleri, eğer standart besin ortamının dışında uygun bir besin ortamında kültüre edilirse tüm bitkiye farklılaşabilme yeteneğine sahiptir. Kalluslar, kültür ortamında sert ya da kırılgan formda olmalarına göre ayrılabilirler. Kırılgan kallus kültürleri, sıvı besin ortamı içinde, karıştırılarak tekli-hücre kültürlerini oluşturmaları için kültüre edilebilmektedir (Efferth, 2019).

Bitki hücre kültürlerinin üretim sürecinin endüstriyel olarak ölçek büyütmesi için elzem basamak, hücre biyokütlesinin artışına imkan tanıyan, sıvı besiyerinde çoğaltım adaptasyonlarının sağlanmasıdır. Süspansiyon kültürlerinin giderek artan kapasitedeki biyoreaktörlerde çoğaltıma yavaş yavaş adapte edilmesi gerekmektedir. Dalga-çalkalamalı biyoreaktörler, devamlı çalkalamalı tank biyoreaktörler, kabarcık kolon biyoreaktörleri, hava kaldırmalı biyoreaktörler, kule biyoreaktörleri, akışkan yatak biyoreaktörleri, foto biyoreaktörler gibi farklı çalışma mekanizmalarına sahip biyoreaktör çeşitleri bitki hücre kültürlerinin ölçek büyütmelelerinde kullanılabilmektedir (Toso ve diğ., 2009; Su ve diğ., 2019).

2.2.1. Bitki Hücre Kültürü ile Sekonder Metabolit Üretimi

Yüksek bitkiler, 200,000'den fazla özelleşmiş metabolit veya doğal bileşik olarak da bilinen sekonder metabolit üretmektedir. Bitki sekonder metabolitleri, doğal kauçuk, boya, tadlandırıcı, koku, baharat, doğal katkı, mikrobisit, insektisit ve farmasötik olarak kullanımlara sahip oldukları için büyük ilgi görmüştür (Nomura ve diğ., 2018).

Bitki hücre kültürleri, 30,000'den fazla kimyasal bağ içeren çok değerli sekonder metabolitleri sentezleme potansiyeline sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı bitki hücre kültürleri, kozmetik, gıda ve ilaç gibi endüstrilerinde sekonder metabolitlerin sürdürülebilir ve büyük ölçekli üretimlerinde kullanılabilmektedir. Tıbbi bitkilerden elde edilen hücre kültürleri kanser, kardiovasküler, nörodejenarif hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilen biyoaktif farmasötikleri üretebilmektedir (Tablo 2.1). Önemli biyolojik aktiviteleri olan bitki sekonder metabolitlerinin üretimi bazı firmalar tarafından

ticarileştirilmiştir. Bitki hücre kültürü kaynaklı, farklı ticari sekonder metabolitler (şikinin, skopolamin, protoberin, rosmarinik asit, ginseng saponinleri ve bağışıklık sistemi uyarıcı polisakkartiler) 1980'lerin başı ve 1990'ların sonunda piyasaya girmiştir (Eilb ve diğ., 2018). Anti-tümör, anti-HIV ve anti-inflamatuar özelliklere sahip 'şikinin' *Lithospermum erythrorhizon* hücre kültürlerinden Mitsui Petrochemical Industries (Japonya) firması tarafından, anti-inflamatuar aktiviteye sahip 'rosmarinik asit' *Coleus blumei* hücre kültürlerinden Nattermann (Almanya) firması tarafından, gıda takviyesi olarak 'ginseng', *Panax ginseng* hücre kültürlerinden Nitto Denko (Japonya) firması tarafından elde edilerek ticarileştirilmiştir (Kolewe ve diğ., 2008).

Bitki hücre kültürü sistemlerinin başarılı ticari örneklerinden en göze çarpanı, yenilikçi araştırma ve yeni teknolojilerin kullanımı sayesinde paklitakselin üretimidir. Paklitaksel, *Taxus* türlerinden elde edilen, meme, yumurtalık ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi kanser tiplerinin birinci basamak tedavilerinde kullanılan önemli bir antikanser ajandır. Paklitakselin 300 mg'lık bir dozu için 100 yıllık porsuk ağacının feda edilmesi gerekmektedir. Bundan dolayı paklitaksel eldesi için yavaş büyüyen porsuk ağacının hasatına alternatif olarak bitki hücre kültürleri ile üretimi için 1980'lerden beri çalışılmıştır. Süreç mühendisliği ve yönlendirilmiş biyosentez uygulamalarının birleştirilmesi hücre kültür sistemlerinin veriminin önemli derecede artmasını sağlamıştır. Bu sayede Phyton Biotech ve Bristol-Myers Squibb firmaları tarafından önemli bir ticari başarı ile paklitakselin bitki hücre kültürü sistemi ile temini sağlanmıştır (Kolewe ve diğ., 2008; Eilb ve diğ., 2018). Phyton Biotech, 75,000 L boyuttaki biyoreaktörler ile taksanların büyük ölçekli üretimini yapan dünyanın en büyük, GMP bitki hücre kültürü tesisini işletmektedir (Gonçalves ve Romano, 2018).

Tablo 2.1: Bitki hücre kültürü ile tıbbi bitkilerden elde edilen bazı fitokimyasallar (Güven ve Gürsul., 2014; Efferth, 2019).

Bitki ismi	Üretilen Fitokimyasal
<i>Abrus pectorius</i>	Glisirizin
<i>Arachis hypogaea</i>	Resveratrol
<i>Arnebia euchroma</i>	Şikonin
<i>Brugmansia candida</i>	Hiyosiyamin
<i>Brugmansia suaveolens</i>	Tropan alkaloidleri
<i>Calendula officialis</i>	Oleanolik asit
<i>Camptotheca acuminata</i>	Kamptotesin ve 10-hidroksikamptotesin
<i>Carthamus tinctorius</i>	Alfa tokoferol
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	Kersetin
<i>Coleus blumei</i>	Rosmarinik asit
<i>Datura stramonium</i>	Tropan alkaloidleri
<i>Drosera burmanii</i>	Plumbagin
<i>Eschscholtzia California</i>	Sanguinarin
<i>Ginkgo biloba L</i>	Ginkgolid B and ginsenosit
<i>Glycine max</i>	Apigenin, daidzein, genistein, and luteolin
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Soyasaponin
<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperisin and hiperforin
<i>Linum flavum</i>	Podofilotoksin

Tablo 2.1 (devam): Bitki hücre kültürü ile tıbbi bitkilerden elde edilen bazı fitokimyasallar (Güven ve Gürsul., 2014; Efferth, 2019).

<i>Linum narbonense, Linum (L.) tenuifolium, L. bienne, and L. glaucum</i>	Justisidin B
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Şikonin ve rosmarinik asit
<i>Ocimum basilicum</i>	Rosmarinik asit
<i>Podophyllum hexandrum</i>	Podofilotoksin
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Ajmalin, serpentin and reserpin
<i>Rubia tinctorum</i>	Tropan alkaloidleri
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Rosmarinik asit, salvianolik asit B
<i>Silybium marianum</i>	Silmarin
<i>Solidago chilensis</i>	Klorojenik asit ve rutin
<i>Taxus baccata</i>	Paklitaksel
<i>Taxus chinensis</i>	Paklitaksel
<i>Vitis vinifera</i>	Stilben, resveratrol, and antosiyaninler

2.2.2. Bitki Hücre Kültürünün Kozmetikte Kullanımı

Kozmetik sektöründe kullanıcılara her yıl yüzlerce yeni kozmetik ürün sunulmaktadır. Ürünlerdeki bu yenilik ve gelişmeler kullanıcılar tarafından sıkı bir şekilde takip edilmektedir. Kullanıcılar yalnızca etkili, güvenli ve doğal olan kozmetik ürünleri değil aynı zamanda üretim esnasında çevreyi negatif olarak etkilemeyen ve sürdürülebilir kozmetik ürünleri talep etmektedir (Schmid ve Züllü, 2012).

Tüm bitkinin kullanımı yerine bitki hücre kültürlerinin kullanımı kozmetik üretiminin daha az enerji ve daha düşük çevre etkisi ile bölge ve mevsimden bağımsız olarak yapılabilmesine imkan tanımaktadır. Bunun yanı sıra nadir bulunan veya soyu tükenmekte olan bitki türlerinin de bitki hücre kültürü teknolojisine uygulanması mümkündür. Aynı zamanda bitki hücre kültürlerinden elde edilen ekstraktlar bağışıklık sistemi yanıtına yol açmayan, insan vücudu için güvenli pek çok biyolojik aktif bileşiğin kaynağıdır. Bunların yanında bitki hücre kültürlerinin birçok pozitif kozmetik etkisi olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Eibl ve diğ., 2018; Miastkowska ve Sikora, 2018).

Malus domestica hücre kültürü ekstraktının, senesense karşı deri kök hücrelerinin canlılığını ve dayanıklılığını olumlu yönde etkilediği, deri ve saç yenilenmesini teşvik ettiği, cilt yaşlanması görünümünü azalttığı bildirilmiştir. Çalışmanın *in vivo* test sonucuna göre *Malus domestica* hücre kültürü ekstraktı içeren formülasyonu günde 2 defa kullanan gönüllü kişilerin kaz ayağı kırışıklıkları 4 hafta sonunda %15 oranında azalmıştır (Schmid ve diğ., 2008). Tito ve diğ., (2011) *Lycopersicon esculentum* hücre kültürü ekstraktının ağır metal uyarımlı hasara karşı DNA onarımını aktive ettiğini, Barbulova ve diğ., (2010) *Rubus ideaus* hücre kültürü ekstraktının güçlü anti-inflamatuar ve antioksidan aktivite gösterdiğini ve bu sayede oksidatif strese karşı koruyucu olduğunu bildirmiştir. *Syringa vulgaris* yaprak hücre kültürü ekstraktının, içerdiği verbaskositler sayesinde anti-inflamatuar, yaşlanma karşıtı aktiviteye sahip olduğu, Ginseng kallus kültürü ekstraktının ginseng saponinleri ve polisakkaritleri içeriğinden dolayı yaşlanma karşıtı aktivitesinin olduğu raporlanmıştır (Miastkowska ve Sikora, 2018). Bu avantajlarından dolayı cilt ve saç bakımı için aktif hammadde olarak bitki hücre kültürü ekstraktları yoğun ilgi görmektedir.

Sağladığı pek çok avantaj ve gördüğü yoğun ilgiden dolayı bitki hücre teknolojisi kullanılarak son on yıldır çok sayıda kozmetik aktif hammadde üretilmiştir. Bitki hücre kültürü ile ticari

olarak kozmetik hammadde üretimine 2008 yılında Mibelle Biochemistry (İsviçre) firması PhytoCellTech™ (PCT) adını verdikleri teknoloji ile öncülük etmiştir. Bu teknolojiye, bitki hücreleri biyoreaktörde üretildikten sonra yüksek basınçlı homojenizatör ile bitki hücre duvarları parçalanmakta ve hücredeki lipofilik bileşikler lipozom içinde enkapsüle edilirken hidrofilik bileşikler su fazında çözünmektedir. Elde edilen lipozomlu hücre kültürü bileşenleri aktif hammadde olarak kullanılabilir. Firma PCT™ *Malus domestica* adlı ürünü, İsveç elmasının meyve hücre kültürü ile üretmektedir. Ürün, insan deri kök hücrelerinin canlılığını koruyucu, yaşlanma karşıtı aktiviteleri ile sunulmaktadır. Aynı teknoloji kullanılarak firma, üzüm hücre kültürü ile elde ettiği fotoyaşlanma karşıtı PCT™ Solar Vitis'i, *Rhododendron ferrugineum* yaprak hücre kültürlerinden elde edilen cilt bariyerini güçlendirici, epidermal yenilenmeyi teşvik edici ve cildi çevresel koşullara karşı koruyucu aktiviteye sahip PCT™ Alp Rose'u, *Saponaria pumila* hücre kültürlerinden, cilt elastikiyetini ve sıkılığını arttırıcı, çevresel hasara karşı koruyucu aktiviteye sahip PCT™ nunatak adlı ürünleri piyasaya sürmüştür (Barbulova ve diğ., 2014; Eibl ve diğ., 2018; Miastkowska ve Sikora, 2018).

Bitki hücre kültürlerinin kozmetik aktif hammaddesi olarak kullanımına diğer bir örnek ise IRB (Italian Company Istituto di Ricerche Biotechnologiche, İtalya) firmasının High Tech Nature™ (HTN) teknolojisidir. Bu yöntem gliserin içinde bitki hücrelerinin, içerdikleri sekonder metabolitler, polisakkarit kompleksi, fitoesterol ve aminoasitler ile beraber karıştırılmasını içermektedir. Bu yöntem ile *Echinacea angustifolia* bitkisinin hücre kültürlerinden elde edilen kapiler geçirgenliği azaltarak koyu halka giderici aktiviteye sahip *Echinacea angustifolia* stems G™, *Leontopodium alpinum* bitki hücrelerinden elde edilen, antioksidan, kolajen kaybını önleyici ve kırışıklık giderici aktiviteye sahip *Leontopodium alpinum* stems G™, *Buddleja davidii* bitkisinin hücre kültürlerinden elde edilen dermis bileşenlerinin UV-uyarımli oksidatif stresten koruyucu ve foto yaşlanma koruyucu aktiviteye sahip *Buddleja davidii* stems G™, *Gardenia jasminoides* hücre kültürü ekstraktından elde edilen, MMP-1 sentezini azaltıcı ve kolajenaz aktivitesini baskılama aktivitesi olan *Gardenia Stems GX™* Sederma firması (Croda Personal Care, İngiltere) tarafından ticarileştirilen ürünlerdir (Morus ve diğ., 2014; Trehan ve diğ., 2017; Georgiev ve diğ., 2018; Eibl ve diğ., 2018).

Naolys (Fransa) firması da bitki hücre kültürlerini toz hücre ve gliserin bazlı ekstrakt formunda kozmetik aktif hammaddesi olarak kullanılmak üzere üretmiştir. *Lilium candidum* yaprak hücre kültürü ekstraktını (Bright Light Madonna Lily) aydınlatıcı ve yenileyici, *Bombax costatum*

yaprak hücre kültürü ekstraktını (Sun Protect Date Palm) koruyucu ve yatıştırıcı, *Zingiber officinale* yaprak hücre kültürü ekstraktını (Refine Ginger) sıkılaştırıcı, matlaştırıcı ve nemlendirici aktif hammadde olarak üretmektedir (Morus ve diğ., 2014; Trehan ve diğ., 2017; Eibl ve diğ., 2018; Miastkowska ve Sikora, 2018).

Yukarıda bahsedilen ürünlerin dışında da bitki hücre kültürlerini, yaşlanma karşıtı, anti-mikrobiyal, yatıştırıcı, nemlendirici, UV koruyucu, cilt yenileyici, saç dökülmesini önleyici ve sıkılaştırıcı gibi bir farklı aktivitelere sahip kozmetik hammaddeleri olarak üretim ve satışını yapan başka firmalar da bulunmaktadır (Georgiev ve diğ., 2018).

Modern kozmetiklere yönelik kullanıcıların talebi her şeyden önce güvenlik olmasına rağmen bunun yanında görünür etkiler de beklenmektedir. Önemli diğer bir unsur ise ürünün yenilikçi ve ekonomik avantajlarının da olmasıdır. Bitki hücre kültürü ekstraktları içeren preparasyonlar bu gerekliliklerin tamamını karşılayarak 21. yüzyıl kozmetoloji piyasa beklentilerini eksiksiz yerine getirmektedir (Morus ve diğ., 2014).

Bu çalışmada soya bitkisinden hücre kültürlerinin elde edilmesi ve soya hücre kültürü ekstraktının cilt beyazlatıcı bileşen olma potansiyelinin *in vitro* olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Soyada bulunan, anti-tirozinaz ve melanogenez baskılama aktivitesine sahip birçok izoflavonoidin sinerjik etkisinin değerlendirilmesi için soya bitkisinden hücre kültürleri elde edilmiştir. Soya hücre kültüründen elde edilen ekstrakttaki toplam fenolik bileşik ve izoflavonoidlerin miktarı belirlenmiştir. Soya hücre kültürü ekstraktının melanin sentezine ve tirozinaz aktiviteye etkisi B16-F10 melanoma hücrelerinde incelenmiştir. Soya hücre ekstraktının transkripsiyonel olarak melanogeneze etkisini belirlemek için RT-qPCR ile melanogenez ilişkili genleri ifadesi, Western Blot yöntemi ile ise proteinlerin ifadesi analiz edilmiştir. Çalışmamızda, birçok izoflavonoid içeren soya hücre ekstraktının melanogeneze etkisi *in vitro* olarak ortaya konmuştur.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Bitki hücre kültüründe ve kimyasal analizlerde kullanılan malzemeler; Tween 20 (P1379, Sigma), Vitamin içeren MS besiyeri (MSP09, Caissonlab), 2,4 D (D001, Caissonlab) süktroz (S011, Caissonlab), Gelrite (G024, Caissonlab), Gallik asit (G7384, Sigma), MS-Kalite Metanol (1060352500, Merck millipore), Formik asit (64-18-6, Merck millipore), Amonyum asetat (631-61-8, Merck),

Hücre kültürü malzemeleri; MTT (A2231, Applichem), DMSO (A3672, Applichem), DMEM (41966-029, Gibco) IMDM (21980-032, Gibco), FBS (10270-106, Gibco), Tripsin/EDTA (25200-056, ThermoFisher Scientific), Kojik asit (K3125, Sigma), α -MSH (M4135, Sigma), L-DOPA (D9628, Sigma), PMSF (329-98-6, Biomatik), Triton X-100 (9002-93-1, Santacruz), RNA ve cDNA çalışmalarında kullanılan malzemeler; RNA izolasyon kiti (Pure Link RNA mini kit, Life Technologies), cDNA sentez kiti (High Capacity cDNA Revers Transcription Kit, Applied Biosystems), ACTB (Assay ID: 316568, RealTime Ready Custom Single Assays, Roche), TYR (Assay ID: 316568, RealTime Ready Custom Single Assays, Roche), TYRP1 (Assay ID: 316563; RealTime Ready Custom Single Assays, Roche) ve TYRP2 (Assay ID: 317497; RealTime Ready Custom Single Assays, Roche) ve MITF (Assay ID: 315218; RealTime Ready Custom Single Assays, Roche) genlerine ait primer ve prob kiti,

Protein çalışmalarında kullanılan malzemeler; Protein izolasyon tamponunu (RIPA Buffer, Thermo Scientific), BCA protein miktarı belirleme kiti (Pierce BCA protein assay kit, Thermo Scientific), %4-12 Bis Tris jel (Nupage %4-12 Bis tris protein gels, Thermo Scientific), 20X elektroforez yürütme tamponu (Nupage MES SDS Running Buffer 20X, Thermo Scientific), Protein marker (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standart), Protein örneği tamponu (Bolt LDS Sample Buffer, İnvitrogen), protein örneği indirgeyici ajan (Bolt Sample Reducing Agent 10X, invitrogen), Blotlama kiti (iBlot Transfer Stacks, nitrocellulose, ThermoFisher Scientific), kromojenik deteksiyon kiti (WesternBreeze Chromogenic kit, ThermoFisher Scientific), Beta-Aktin primer antikor (Sc-47788, SantaCruz) TYR primer antikor (Sc-20035, SantaCruz), TYRP1 primer antikor (Sc-166857, SantaCruz), TYRP2 primer antikor (74439, SantaCruz) MITF primer antikor (Sc-56725, SantaCruz).

3.2. BİTKİ DOKU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.2.1. Besin Ortamlarının Hazırlanması

Tohum çimlendirme ortamı için 4,3 gram MS besiyeri (Murashige and Skoog medium, 1962) makro, mikro ve vitamin karışımı ve 30 gram süktroz 900 ml ultra saf su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. Besin ortamının pH'ı 1 N NaOH ve 1 N KOH kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim ultra saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Final hacmi tamamlanan besiyerine 4 gram jelleştirici ajan eklendikten sonra besiyeri ısıtılarak jelleştirici ajanın çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan besiyeri cam kavanozlara döküldükten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sıvı sterilizasyon programında steril edilmiştir. Hazırlanan besiyerleri, kontaminasyon kontrolü için 1 hafta oda sıcaklığında bekletildikten sonra *in vitro* tohum çimlendirme çalışmalarında kullanılmıştır. MS besiyeri içeriği Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: MS besiyeri bileşenleri.

Bileşenler	Konsantrasyon (mg/L)
Amonyum Nitrat (NH_4NO_3)	1650.0
Borik asit (H_3BO_3)	6.2
Kalsiyum Klorür (CaCl_2)	332.2
Kobalt Klorür, Hekzahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Bakır Sülfat, Pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Sodyum EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.26
Demir Sülfat, Heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8
Glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	2.0
Magnezyum Sülfat (MgSO_4)	180.7
Mangan Sülfat, Monohidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.9
Sodyum molibdat, dihidrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25

Tablo 3.1 (devam): MS besiyeri bileşenleri.

Myo-inositol ($C_6H_{12}O_6$)	100.0
Nikotinik Asit ($C_6H_5NO_2$)	0.5
Potasyum İyodür (KI)	0.83
Potasyum Nitrat (KNO_3)	1900.0
Potasyum Fosfat ($KH_2P O_4$)	170.0
pPiridoksin Hidroklorür ($C_8H_{11}NO_3, HCl$)	0.5
Tiyamin Hidroklorür ($C_{12}H_{17}ClN_4OS, HCl$)	0.1
Çinko Sülfat, Heptahidrat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	8.6

Kallus uyarım ortamları için 4,3 gram vitamin içeren MS besiyeri makro, mikro ve vitamin karışımı, farklı oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri ve 30 gram süktroz 900 ml ultra saf su içinde çözülmüştür. Besiyerlerinin pH'ı 1 NaOH ve 1 N KOH kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra final hacim ultra saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Son olarak 4 gram jelleştirici ajan eklendikten sonra besiyerleri otoklavda 121 °C'de 15 dakika sıvı sterilizasyonu programında steril edilmiştir. Steril besiyerleri 50-55 °C'ye kadar soğuduktan sonra steril cam petrilere dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyerleri cam petrilere donduktan sonra petrilere etrafı streç film ile çevrelenerek oda sıcaklığında stoklanmıştır. Kontaminasyon kontrolü için 1 hafta oda sıcaklığında beklenen kallus uyarım ortamları çalışmalarda kullanılmıştır. Kallus uyarımı için hazırlanan 26 farklı besiyerindeki bitki büyüme düzenleyici çeşit ve miktarları Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Kallus uyarımında kullanılan besiyeri içerikleri.

Besin Ortam Adı	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)			
	2,4 D	NAA	BAP	Kinetin
G1	-	0,5	-	-
G2	-	0,5	0,25	-
G3	-	1	-	-
G4	-	1	0,25	-
G5	-	1	0,5	-
G6	0,5	-	-	-
G7	0,5	-	0,25	-
G8	1	-	0	-
G9	1	-	0,25	-
G10	1	-	0,5	-
G11	0,5	-	-	0,25
G12	1	-	-	0,25
G13	1	-	-	0,5
G14	1,25	-	0,25	-
G15	1,25	-	0,5	-
G16	1,25	-	-	0,25
G17	1,25	-	-	0,5
G18	2	-	0,5	-
G19	2	-	1	-

Tablo 3.2 (devam): Kallus uyarımında kullanılan besiyeri içerikleri.

G20	2	-	-	0,5
G21	2	-	-	1
G22	-	0,5	-	0,25
G23	-	1	-	0,25
G24	-	1	-	0,5
G25	-	1,25	-	0,25
G26	-	1,25	-	0,5

3.2.2. *In Vitro* Fidelerinin Elde Edilmesi

Yüzey sterilizasyonu için saf soya hattına (Plant ID: DSR-352, PI number: PI556709, USDA), ait tohumlar 1-2 damla Tween 20 eklenmiş %20 sodyum hipoklorit (%4,7 aktif NaOCl₂ içeren ticari çamaşır suyu) içinde, çalkalayıcı üzerinde 20 dakika inkübe edilmiştir. Tohumlar sterilize edildikten sonra 3-4 defa steril distile su ile durulanıp %3 süktroz içeren MS besiyeri bulunan cam kavanozlara alınıp karanlıkta 25°C’de çimlenene kadar inkübe edilmiştir. Tohumlar çimlendikten sonra *in vitro* soya fidelerinin gelişimi 4000 lüks ışık, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olarak ayarlanmış fotoperiyota alınmıştır.

3.2.3. Kallus Kültürü

Kallus uyarımı için *in vitro* soya fidelerinin gövde eksplantları bistüri pens yardımıyla yaralanarak farklı oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarına (G1-G26) yerleştirilmiştir. Farklı besin ortamlarına alınan eksplantlar 25±2°C’de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Eksplantlardaki değişiklikler günlük olarak takip edilmiş olup eksplantlar 3-4 haftalık periyotlarda taze besin ortamına transfer edilerek alt kültüre alınmıştır.

3.2.4. Süspansiyon Kültürü

4-6 haftalık kalluslar, en verimli kallus uyarımını sağlayan besin ortamının sıvı halini içeren erlenlerde, 25 °C’de, inkübatörlü karıştırıcı üzerinde 110 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 20 gün sonra süspansiyon olmayan hücre agregatlarını uzaklaştırmak için soya hücre süspansiyonu 500 µM por boyutuna sahip steril elekten geçirilmiştir. 12-14 günlük periyotlarda soya hücre süspansiyonları taze besiyeri ile alt kültüre alınarak süspansiyonların çoğaltımı sağlanmıştır. Yeterli miktara ulaşan soya hücre süspansiyonları, alt kültüre alınmalarından 14 gün sonra hasat edilmiştir. Hasat edilen soya hücreleri filtre kâğıdı ile süzülüp besin ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 3-4 defa distile su ile yıkanmıştır. Süzülen hücreler liyofilizatör ile kurutulmuştur.

3.2.5. Hücre Çoğalma ve Canlılık Testleri

Soya hücre süspansiyonlarının çoğalmalarının belirlenmesinde PCV (Sıkıştırılmış Hücre Hacmi) ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. PCV belirlemede Vargas ve Flota (2006)’nın kullandığı prosedür izlenmiştir. Soya hücre süspansiyonlarının çoğalma miktarları, 14 günlük periyotlarda, PCV ölçümü ile değerlendirilmiştir. Soya hücre süspansiyonları serolojik pipetle karıştırıldıktan sonra steril bir santrifüj tüpüne 5 ml süspansiyon aktarılmıştır. Hücreleri çöktürmek için tüp 200 g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Aşağıdaki denklik kullanılarak hücrelerin PCV değerleri belirlenmiştir:

$$PCV = \frac{\text{Çöken hücre hacmi}}{\text{toplam hacim}} \times 100$$

Soya süspansiyon hücrelerinin canlılığının belirlenmesinde ise FDA (floresin diasetat) yöntemi kullanılmıştır. FDA, plazma membranından geçebilen ve negatif yüklü, florogenik bir ester bileşiğidir. FDA hücrel esterazlar ile hidrolize edildiğinde membran geçirgenliği olmayan yeşil floresanslı floresin oluşmaktadır. Bu yüzden FDA metabolik olarak aktif canlı hücreler için bir test yöntemi olarak kullanılmaktadır (Jones ve diğ., 2016). FDA yöntemi ile bitki hücrelerinin canlılık analizleri Mustafa ve diğ., (2011) tarafından belirtilen protokole göre yapılmıştır.

FDA stoğu, 2 mg/ml olacak şekilde aseton içinde hazırlanmıştır ve -20°C’de stoklanmıştır. Hücre canlılık testi öncesinde 10 µl FDA solüsyonu 500 µl besiyeri içinde seyreltilmiştir. Ardından 500 µl hücre süspansiyonu FDA solüsyonu ile karıştırılıp lam ve lamel arası preparat yapılarak hücreler floresans mikroskopta (InCellis Cell Imager for Brightfield, Bertin

Technologies) GFP ışık modülü (GFP Fluo Light Module Ex 475/20- Em 518/32, Bertin Technologies) kullanılarak incelenmiştir. Preparattaki 500 adet hücre 5 dakika içinde, floresans boyanan hücre ve toplam hücre olmak üzere sayılmıştır. Parlak floresans hücreler canlı hücreleri, floresans olmayan veya zayıf floresans hücreler ölü hücreleri temsil etmektedir. Bu kriterlere göre canlı ya da ölü kabul edilen hücrelerin aşağıdaki denklige göre %canlılık oranları belirlenmiştir:

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = \text{Floresans hücre sayısı} / \text{toplam hücre sayısı} \times 100$$

3.3. EKSTRAKSİYON

Ekstraksiyon işlemi için 20 gram liyofilize soya hücresi, 200 ml %70 etanol içinde 24 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 110 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında etanol-soya hücre karışımı 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çözünmeyen hücre kalıntılarının çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant kısmı 0,2 µm mikrofiltreden geçirildikten sonra çözücü evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Evaporatörde yoğunlaştırılan ekstrakt liyofilize edildikten sonra -20°C'de stoklanmıştır (Panizzi ve diğ., 2002).

3.4. FOLIN CIOCALTEU YÖNTEMİ İLE TOPLAM FENOLİK BİLEŞEN ANALİZİ

Folin Ciocalteu (FC) yönteminin prensibi, 765 nm spektroskopik olarak belirlenebilen, alkali ortamda elektronların fenolik bileşiklerden fosfomolibdik/fosfotungistik asit komplekslerine (Folin Ciocalteu reaktifine) transferine dayanmaktadır (Ainsworth ve Gillespie, 2007).

Soya hücre ekstraktının toplam fenolik içeriğini belirlemede Ainsworth ve Gillespie (2007)'nin FC yöntemi için kullandıkları prosedür uygulanmıştır: Soya hücre ekstraktı (1 mg/ml), standart ve %95 metanolden (Blank) 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 100'er µl eklenmiştir. Her bir tüpe 200 µl Folin-Ciocalteu (%10, V/V) reaktifi eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra her bir tüpe 800 µl 700 mM Na₂CO₃ eklenmiş ve tüpler oda sıcaklığından 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 96-kuyucuklu plakalara ekstrakt, standart ve blank solüsyonu bulunan tüplerden 200 µl aktarılmış ve 765 nm'de mikropakanın absorbansı mikropaka okuyucu (Eon, BioTek) ile ölçülmüştür. Gallik asit dozlarından elde edilen absorbanslar kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur. Gallik asit standartları ile A₇₆₅ arasındaki regresyon denklemi kullanılarak soya hücre ekstraktının toplam fenolik miktarı gallik asit eşdeğerine göre hesaplanmıştır.

3.5. LC-MS/MS ANALİZİ

Kütle spektrometreleri, manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek ölçme prensibi ile çalışan cihazlardır. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir. LC-MS/MS cihazıyla öncelikle moleküller iyonizasyon işlemi ile yüklü iyonize moleküller haline dönüştürülürler. Yüklü moleküller stabil değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır. Bunun için iyonizasyon aşamasının ardından iyonize moleküller collision gaz adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile parçalanırlar. Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütleye ve yüke sahiptir. Bu sayede iyonlar (product ion) üzerinden molekülün teşhis ve miktar tayini yapılır. Aynı kütle/yük (m/z) oranına sahip pek çok molekül mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10000'dir. Bu sebeple LC-MS/MS kantitatif uygulamalar için yüksek bir duyarlılık ve kesinlik sağlar (Biberoğlu 2003; Eser ve Dinçel, 2018).

Soya hücre ekstraktlarının fenolik bileşenlerin analizi LC-MS/MS (LCMS/MS-8040 triple quadropol, Shimadzu) cihazı ve cihazda kayıtlı olan LabSolutions yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS ile 12 farklı fenolik bileşik analiz edilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: LC-MS/MS cihazı ile analiz edilen fenolik bileşikler.

	Fenolik Bileşik
1	Daidzin (Daidzein 7-glukosit)
2	Daidzein
3	Glisitein 7-glukosit (glisitin)
4	Glisitein
5	Genistein
6	Genistein 7-glukosit (Genistin)
7	7,3',4'-trihidroksiizoflavon (3-Hidroksidaidein)
8	7,8,4'-trihidroksiizoflavon (8-Hidroksidaidein)
9	Kumarin

Tablo 3.3 (devam): LC-MS/MS cihazı ile analiz edilen fenolik bileşikler.

10	Ferulik asit
11	Hesperidin
12	Naringin

Fenolik bileşiklerin analizi için öncelikle LC-MS/MS cihazında, fenolik bileşiklere ait standartların optimizasyonu yapılmıştır. Fenolik bileşiklerin LC-MS/MS analizleri için gerçekleştirilmiş olan işlemler aşağıda listelenmiştir:

1. Uygun çözücüde hazırlanmış standart maddelerin iyonlaşma durumları (Pozitif veya Negatif yönde) ve ana iyonları (prekürsör iyon) belirlenmiştir.
2. 35-10 V aralığında çarpışma enerjileri (Collision Energy) uygulanarak ürün iyon taraması (Product ion search) yapılmıştır. Parçalanma sonrası oluşan moleküle spesifik fragmentler belirlenmiştir.
3. Ürün iyon taramaları sonucunda elde edilen iyon fragmentleri değerleri ve prekürsör iyon bilgileri kullanılarak kantitatif tayin için MRM (Multiple Reaction Monitoring) çalışması yapılmıştır. MRM modu ile voltaj optimizasyonu ile prekürsör iyon ve ürün voltajı ayarlanmıştır.
4. Fenolik bileşiklere ait MRM verileri birleştirildikten sonra cihazda, analiz koşulları belirlenerek metot oluşturulmuştur (Tablo 3.4).
5. Kantitatif tayin için optimizasyonu yapılan standartların kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.
6. Soya hücre ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin analizi için standartlar ile oluşturulan metot kullanılarak analizler (Real Time Batch) gerçekleştirilmiştir. Analiz sonrasında ekstraktlardaki fenolik bileşiklerin miktarı LabSolutions yazılımı ile standartların kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir.

Standart fenolik bileşikler, DMSO içinde 1000 ppm (1mg/ml) olacak şekilde çözdürüldükten sonra %50 metanol (MS kalite) içeren ultra saf su içinde 10 ppm ve 1 ppm ara stoklar hazırlanmıştır. Standartların optimizasyonunda 1 ppm'lik stoklar, kalibrasyon eğri çiziminde ise 10 ppm'lik stoklar kullanılmıştır. Standartların 10 ppm'lik stoklarından tüm standartların 25, 50, 75, 100, 250, 500 ve 1000 ppb'lik konsantrasyonlarını içeren kalibrasyon çözeltileri elde edilmiştir. Bu standart karışım çözeltileri ile LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

LC-MS/MS analizi için soya hücre ekstraktı 20 mg/ml olacak şekilde %50 metanol içinde çözdürülmüştür. Çözünen ekstrakt 0,2 µm mikrofiltreden geçirildikten sonra analiz edilmiştir.

Tablo 3.4: LC-MS/MS Analizlerinde Kullanılan HPLC ve MS koşulları.

	HPLC Koşulları		
	Kolon: İnertsil ODS-4 2µm 3.0x100 mm		
	Mobil Faz A: Ultrasaf su içerisinde 5mM Amonyum Format ve %0.1 Formik Asit Mobil Faz B: Metanol		
	Enjeksiyon Hacmi: 10 µL		
	Başlangıç Akışı: 0,3ml/dk		
	Kolon Fırını: 40 °C		
	Gradient Akışı		
Dakika	Mod	Komut	Akış
8 dk.	Pompalar	B conc. %	80
8,01 dk.	Pompalar	B conc. %	20
12 dk.	Kontrolör	Bitiş	-
	MS Koşulları		
	İyonlaştırma Tekniği: ESI(+),(-)		
	İyon Püskürtme Voltajı: 4500 V		
	Blok Isıtıcı Sıcaklığı: 450 °C		
	Nebulize Gaz: 2 L/dk		
	Kurutucu Gaz: 10 L/dk		
	Çarpışma Gazı: Argon (230 psi)		

3.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ HAZIRLANIŞI

B16-F10 (CRL-6475, ATCC) fare melanoma hücreleri, %10 FBS (Fetal sığır serum), 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, 1 mM sodyum pürivat ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içinde 37°C'de, %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.

CRL-2076 (CCD-1064Sk, ATCC) insan normal dermal fibroblast hücreleri, %10 FBS, 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukoz ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat içeren IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) içinde içinde 37°C'de, %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.

Hücreler 25 ve 75 cm²'lik kültür kaplarında inkübe edilmiştir. Alt kültür işlemleri %0,25 tripsin/EDTA kullanılarak yapılmıştır. Alt kültürler 2-3 günlük aralıklarla B16-F10 hücreleri için 1:10, CRL-2076 hücreleri için 1:3 oranında gerçekleştirilmiştir.

Tüm deneylerde kullanılan hücreler tripan mavisi ile süspanse edildikten sonra Thoma lamında en az 3 kere sayılmıştır. Mavi olarak boyanmayan canlı hücre miktarlarının ortalaması alınarak ml'deki hücre miktarı belirlenmiştir.

Soya hücre ekstraktı hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere 500 mg/ml olmak üzere %10 etanol içeren distile su içinde çözülmüştür. Ekstrakt -20°C'de stoklanmıştır. Hazırlanan ana stoktan, her deney öncesi medyum ile 50 mg/ml ara stok hazırlanmıştır. Bu ara stoktan hücre kültürü çalışmalarında kullanılan soya hücre ekstraktı final konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.7. MTT CANLILIK TESTİ İLE MİTOKONDRIYAL AKTİVİTE BELİRLENMESİ

MTT yöntemi, suda çözülebilir bir tetrazolyum tuzu olan MTT (-(4,5-Dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid)'in tetrazolyum halkasının canlı hücre mitokondrisinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimiyle kırılmasıyla suda çözünmeyen mor formazanlara dönüşmesi prensibine dayanmaktadır (Abe ve Matsuki, 2000; Fotakis ve Timbrell, 2006).

Soya hücre ekstraktının B16-F10 fare melanoma hücreleri ve normal insan fibroblast hücreleri (CRL-2076) üzerindeki *in vitro* sitotoksitesi, MTT yöntemiyle belirlenmiştir (Mosmann, 1983). B16-F10 fare melanoma ve CRL-2076 normal insan fibroblast hücreleri, enzimatik

olarak (tripsin/EDTA) kültür flasklarından kaldırılıp taze medyum içine toplandıktan sonra 123 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücreler kültür medyumunu içerisinde yeniden süspansiyon edilerek 24 kuyucuklu plaklara her kuyucuğa 100 µl içinde B16-F10 ($0,7 \times 10^5$ hücre /kuyucuk) ve CRL 2076 (1×10^5) hücre /kuyucuk) ekim yapılmıştır. Kültür yarı konfluent tek bir katman oluşturmak amacıyla 24 ± 2 saat (5 ± 1 % CO₂, 37 ± 1 °C, >90 % nem) inkübe edilmiştir. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, kültür üzerindeki medyum aspire edilerek, kuyucuklara soya hücre ekstraktı içeren medyumlar eklenmiştir. Tüm dozlar en az 3 tekrar olacak şekilde uygulanmıştır. Kültür 48 saat boyunca 37 ± 1 °C, 5 ± 1 % CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edilmiştir. 48 saat uygulama sonrası ekstrakt uygulanmış hücreler ve kontrol hücrelerinin büyümeleri ve sistematik hücre ekim hatalarının ayırımı için her plaka mikroskop altında incelenmiştir. Plakaların incelenmesinden sonra, medyum içinde son konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış olan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 125 µl ilave edilmiş ve plakalar karanlık ortamda 37 ± 1 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra plakalardaki MTT solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendikten sonra plaka 3 dakika mikropipetle okuyucuda çalkalama yapıldıktan sonra 570 nm'de absorbans ölçülmüştür. Sitotoksikite belirleme deneyleri farklı zamanlarda en az 3 defa tekrarlanmış olup her deneyde gruplar 4 teknik tekrarlı yürütülmüştür.

In vitro sitotoksikite deneylerinde kontrol grubunun yanında %0,1 etanol içeren çözücü kontrol grubu da kullanılmıştır. Soya hücre ekstraktı konsantrasyonlarının *in vitro* sitotoksikitesi çözücü kontrol grubu absorbansları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Hücrelerin canlılık miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \text{OD}_{450e} \times 100 / \text{OD}_{450k}$$

OD_{450e} : Ekstrakt uygulanmış hücrelerden ölçülen optikal yoğunluğunun ortalama değeridir.

OD_{450k} :Ekstrakt uygulanmamış çözücü kontrol grubundaki hücrelerden ölçülen optikal yoğunluğunun ortalama değeridir.

MTT deneyleri her bir hücre hattı için en az 3 defa tekrarlanmış olup % canlılık grafikleri 3 deneyin absorbanslarının ortalaması alınarak oluşturulmuştur.

3.8. *IN VITRO* MELANİN İÇERİK TESTİ

Soya hücre ekstraktının *in vitro* melanin sentezine etkisi B16-F10 melanoma hücrelerinde '*in vitro* melanin içeriği' testi ile belirlenmiştir.

B16-F10 hücreleri enzimatik olarak (tripsin/EDTA) kültür flasklarından kaldırılıp kültür medyumunu içinde toplandıktan sonra 123 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant vakumla aspire edilmiştir. Hücre pelleti kültür medyumunu içerisinde yeniden süspanse edilerek 6 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 1,5 ml medyum içerisinde aktarım yapılmıştır. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, kültür üzerindeki medyum aspire edilerek, kontrol kuyucuklarına sadece besin ortamı eklenirken diğer tüm kuyucuklara 100 nM α -MSH 2 ml olacak şekilde uygulanıp hücreler yeniden 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besin ortamı uzaklaştırılmış ve kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklara soya hücre ekstrakt dozları ile pozitif kontrol olarak 200 μ M ve 400 μ M kojik asit uygulanarak plakalar 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler tripsin/EDTA ile kaldırılmıştır. Ve hücre pelleti medyum ile süspanse edildikten sonra 200 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant tamamen aspire edildikten sonra hücre pelleti %10 DMSO içeren 1N NaOH içinde 96 kuyulu plakaya alınarak, pelletteki toplam melanin 80 °C'de 1 saat inkübe edilerek çözülmüştür. Süre sonunda 475 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır (Jang ve diğ., 2012; Kim ve diğ., 2013; Jin ve diğ., 2014; Jin ve diğ., 2015). Elde edilen absorbans değerleri ile %melanin içerik belirlenmiştir.

3.9. *IN VITRO* ANTİ-TİROZİNAZ AKTİVİTE TESTİ

Soya hücre ekstraktlarının *in vitro* anti-tirozinaz aktivitesi B16-F10 fare melanoma hücrelerinde '*in vitro* hücrelerarası tirozinaz aktivite' yöntemi ile belirlenmiştir (Kim ve diğ., 2014; Boubaker ve diğ., 2015).

B16-F10 hücreleri enzimatik olarak (tripsin/EDTA) kültür flasklarından kaldırılmış ve medyum içinde toplandıktan sonra 123 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücreler kültür medyumunu içerisinde yeniden süspanse edilerek 6 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 1,5 ml besiyeri içerisinde aktarılmıştır. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, kültür üzerindeki medyum aspire edilerek, kontrol kuyucuklarına sadece besin ortamı eklenirken diğer tüm kuyucuklara 100 nM α -MSH 2 ml olacak şekilde uygulanıp hücreler yeniden 24 saat inkübe

edilmiştir. 24 saat sonrasında kuyucuklardaki besin ortamı uzaklaştırılıp, kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklara soya hücre ekstrakt dozları ile pozitif kontrol olan kojik asitten (200 μ M ve 400 μ M) 3'er ml uygulanarak plakalar 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki hücreler tripsin/EDTA ile kaldırılıp medyum içinde kültür flaskından toplandıktan sonra 200 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüplerdeki süpernatantlar aspire edilmiştir. Liziz işlemi için elde edilen hücre pelletlerine %1 Triton X 100 ve 100 μ M PMSF ile hazırlanmış liziz tamponundan 270 μ l eklenmiştir. Lizatlar 17500 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Her 90 μ l süpernatant için 10 μ l L-DOPA (2 mg/ml) eklenerek L-Dopa-süpernatant karışımı 96 kuyulu plakaya transfer edilmiştir. Plaka 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra her 10 dakikada bir olacak şekilde 475 nm'de 5 defa absorbans ölçümü yapılmıştır. Alınan absorbans değerleri ile hücrelerin tirozinaz aktiviteyi baskılama yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.10. RT-QPCR ANALİZİ İLE MELANOGENEZ İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ

RT-qPCR işlemi temel olarak i) hücrelerden toplam RNA izolasyonu, (ii) tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, (iii) RT-qPCR analizi ve gen ifade değerlerinin alınması olmak üzere 3 adımda gerçekleştirilmiştir.

RNA izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla B16-F10 hücreleri enzimatik olarak (2 ml tripsin/EDTA) kültür flasklarından kaldırılmış, medyum içinde toplandıktan sonra ve 123 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra hücreler kültür medyumunu içerisinde yeniden süspanse edilerek 25 cm² kültür flasklarına $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde aktarılmıştır. Kültür yarı konfluent tek bir katman oluşturmak amacıyla 24 ± 2 saat (%5 $\pm$ 1 CO₂, 37 $\pm$ 1 °C, >%90 nem) inkübe edilmiştir. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, kültür üzerindeki medyum aspire edilerek, kontrol flaskları hariç diğer flasklara 5 ml, 100 nM α -MSH eklenmiştir. Kontrole ise sadece %10 FBS içeren DMEM eklenmiştir. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, kültür üzerindeki medyum aspire edilerek, flasklar PBS ile yıkanmıştır. Ardından kontrol ve α -MSH uygulaması için kullanılan flasklara 5 ml %10 FBS içeren DMEM eklenmiştir. Daha sonra uygulamalarda kullanılan hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyon sonrası hücreler flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra 123 g'de 5 dakika santrifüj edilerek

pelletler elde edilmiştir. Hücre pelletlerinden toplam RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR işlemi temin edilecek kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. RNA İzolasyonu

Hücrelerin inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra tüm flasklardaki medyumlar aspire edilip PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası tüm flasklardaki hücreler tripsin/EDTA ile kültür flasklarından kaldırılmıştır. Hücreler taze medyum içinde toplandıktan sonra 123 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant aspire edilip RNA izolasyonu için liziz işlemine devam edilmiştir. RNA izolasyonu kitin önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Hücre pelletlerinin her birine 600 µl liziz tamponu (594 µl liziz tampon+6 µl B-merkapto etanol) eklenip pelletler liziz tamponu ile pipetleme yardımı ile karıştırılmıştır. 3'er adet steril cam boncuk eklenmiş RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine hücre lizatları aktarılmıştır. Mikrosantrifüj tüplerine alınan lizatlar homojenizatörde 4000 g'de 45 saniye boyunca parçalanmıştır. Homojenizasyonun ardından mikrosantrifüj tüpleri 2600 g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar pellete dokunulmadan RNaz içermeyen yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Süpernatant içeren mikrosantrifüj tüplerine süpernatant hacmi kadar %70'lik etanol eklenmiş ve tüpler kısaca vortekslenmiştir. Mikrosantrifüj içindeki süpernatant etanol karışımlarının 700 µl'si filtreli tüplere aktarılmış ve filtreli tüpler 12000 g'de 25 saniye santrifüj edilmiştir. Filtreli tüplerin dışında yer alan toplama kolonlarında biriken sıvılar uzaklaştırılmış olup filtreli tüplere örneklerden kalan süpernatant-etanol karışımları eklenmiştir. Tüpler tekrardan 12000 g'de 25 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında toplama kolonunda biriken sıvılar uzaklaştırılmış olup filtrelerin üzerinde 700 µl Yıkama-I Tamponu eklenmiştir. Tüpler yeniden 12000 g'de 25 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılıp filtreli tüpler yeni birer toplama kolonuna aktarılmıştır. Filtreli tüplerin üzerine 500 µl Yıkama-II Tamponu eklenip tüpler 12000 g'de 25 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama kolonu boşaltıldıktan sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrasında toplama kolonundaki sıvılar uzaklaştırılıp tüpler 12000 g'de 2 dakika boyunca yeniden santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpler 1,5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. RNA elüsyonu için filtrelere 30 µl RNaz içermeyen su eklenip filtreler 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında tüpler 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra, mikrosantrifüj tüplerindeki filtreli tüpler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen RNA'lerden örnekler alınıp RNA'ların miktar ve saflıkları nano spektrofotometre (Nanodrop 2000 C, Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. RNA'lar kullanılana kadar -86°C'de stoklanmıştır.

3.10.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi kit firmasının talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 4 farklı RNA örneği için 2X RT Master karışımı hazırlanmıştır. 2X RT Master karışımına eklenen bileşenler Tablo 3.5’de açıklanmıştır. Her bir reaksiyon için tüplere 10 µl 2X RT master karışımı, 10 µl final konsantrasyon 100 ng olacak şekilde RNA örneği eklendikten sonra tüpler hafifçe pipetlenerek karıştırılmıştır. Herhangi bir kabarcık kalmaması için tüpler kısaca santrifüj edilmiştir.

Tablo 3.5: cDNA sentezi için hazırlanan 2X RT Master karışımının bileşenleri.

Bileşen	Miktar (µl)
10X RT tamponu	2 µl
25x dNTP karışımı (100mM)	0,8 µl
10X RT random primerleri	2 µl
Revers Transkriptaz	1 µl
RNaz inhibitörü	1 µl
Nükleazsız su	3,2 µl
Toplam hacim	10 µl

Daha sonra tüpler PCR cihazında (T100 PCR Thermal Cycler, Biorad) yerleştirilip Tablo 3.6’da belirtilmiş olan termal döngü sağlanarak cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Termal döngü sonrasında elde edilen cDNA’lar RT-qPCR analizlerinde kullanılabilecek kadar -20°C’de stoklanmıştır.

Tablo 3.6: cDNA sentezinde kullanılan termal döngü.

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre (dk)	10	120	5	∞

3.10.3. RT-qPCR Analizi

RT-qPCR analizlerinde, ilgili gen bölgesini çoğaltacak olan primer çifti ve TaqMan prob içeren Real Time kiti kullanılmıştır. ACTB, TYR, TYRP1, TYRP2 ve MITF genlerine ait primer ve TaqMan prob içeren kitler ile RT-qPCR çalışmaları yürütülmüştür. RT-qPCR reaksiyonları için buz üzerinde her bir genin analizi için ayrı olarak RT-qPCR kokteyli hazırlanmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: RT-qPCR Reaksiyonu Bileşenleri.

Malzeme	Miktar
LightCycler 480 Probes Master	10 µL
RTR Assay	1 µL
Nükleaz-içermeyen H ₂ O	4 µL
Toplam kokteyl hacmi	15 µL

Hazırlanan kokteyl pleyt içerisine, 96 kuyucuklu mikropiakanın her bir kuyusuna 15 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra cDNA'lar, kuyucuklara her bir reaksiyon için 3'er teknik tekrar olacak şekilde 5'er µL hacimde eklenerek son reaksiyon hacmi 20 µL'ye tamamlanmıştır. Mikropiaka, 1500 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir. Son olarak RT-qPCR cihazında (LightCycler 480, Roche) kitin önerdiği kurulum ayarları ve termal döngü sağlanarak reaksiyon yürütülmüştür (Tablo 3.8).

Genlerin ifade değerleri (Ct değerleri), β-aktin (Ct değeri) gen ifade değerine göre normalize edilmiş ve kat artışları $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre (Livak ve Schmittgen, 2001) göre belirlenmiştir.

Tablo 3.8: RT-qPCR termal döngüsü.

Blok tipi		Reaksiyon Hacmi (µl)		
96		10		
Deteksiyon Formatı		Eksitasyon Filtresi	Emisyon Filtresi	
Mono Color Hydrolyolysis Probe/ UPL Probe				
LightCycler 480 Instrument I:FAM		483	533	
LightCycler 480 Instrument II:FAM		465	510	
Programlar				
Program Adı		Döngü	Analiz Modu	
Ön İnkübasyon		1	-	
Amplifikasyon		45	Kantifikasyon	
Soğutma		1	-	
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (C°)		Kazanım Modu	Tutma Süresi	Rampa Oranı (C°/s)
Pre-İnkübasyon	95	-	00:10:00	4.4 (4.8)
Amplifikasyon	95	-	00:00:10	4.4 (4.8)
	60	-	00:00:30	2.2 (2.5)
	72	Tek	00:00:01	4.4 (4.8)
Soğutma	40	-	00:00:30	2.2 (2.5)

3.11. MELANOGENEZ İLİŞKİLİ PROTEİNLERİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

Soya hücre ekstraktının melanoenez ilişkili proteinlerin ifadesine etkisi Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Protein ifade analizi; i). Protein izolasyonu, ii) SDS-PAGE ile proteinlerin ayrıştırılması, iii) Proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), iv) Bloklama ve antikorlarla inkübasyon, v) Kromojenik substrat ile inkübasyon ve görüntüleme olmak üzere 5 aşamada gerçekleştirilmiştir.

Protein izolasyonu için, B16-F10 hücreleri enzimatik olarak (2 ml tripsin/EDTA) kültür flasklarından kaldırılmış, medyum içinde toplandıktan sonra ve 123 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra hücreler kültür medyumunda içerisinde yeniden süspanse edilerek 25 cm² kültür flasklarına $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde aktarılmıştır. Kültür yarı konfluent tek bir katman oluşturmak amacıyla 24±2 saat (%5±1 CO₂, 37±1 °C, >%90 nem) inkübe edilmiştir. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, kültür üzerindeki medyum aspire edilerek, kontrol flaskları hariç diğer flasklara 5 ml 100 nM α-MSH eklenmiştir. Kontrole ise sadece %10 FBS içeren DMEM eklenmiştir. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, kültür üzerindeki medyum aspire edilerek, flasklar PBS ile yıkanmıştır. Ardından kontrol ve α-MSH uygulaması için kullanılan flasklara 5 ml %10 FBS içeren DMEM eklenmiştir. Kojik asit uygulaması için kullanılan flasklara ise 5ml 200 µM kojik asit (%10 FBS içeren DMEM içinde) eklenmiştir. Ardından uygulamalarda kullanılan hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyon sonrası hücreler flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra 123 g'de 5 dakika santrifüj edilerek pelletler elde edilmiştir.

3.11.1 Protein İzolasyonu

Hücre pelletlerinden protein izolasyon RIPA tampon kitinin önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Her tüpteki hücre pelleti üzerine 1 ml RIPA tamponu eklenip tüpler 30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında tüplerdeki örnekler pipetlenerek mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve tüpler 10000 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar yeni birer mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Örneklerin içerdiği protein miktarının belirlenmesi BCA yöntemi ile kitin önerdiği prosedür doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Solüsyon A ve solüsyon B'den 50:1 oranında eklenerek final çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. BSA standart konsantrasyonları kitte verilen oranlara göre

hazırlanmıştır (0, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml). 96 kuyucuklu mikrolaka kuyularına 200 µL çalışma solüsyonu üzerine 25 µL standart ve protein örneklerinden ilave edilmiştir. Ardından plaka 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plaka 25 °C’de 15 dk oda sıcaklığında soğutulmuştur. Ardından plakanın absorbanası 562 nm’de okutulmuştur. Kullanılan BSA standartlarının OD değerleri ile elde edilen standart eğri ile örneklerdeki protein miktarları belirlenmiştir. Protein miktarlarının belirlenmesinden sonra SDS PAGE çalışmasına devam edilmiştir.

3.11.2. SDS-PAGE ile Proteinlerin Ayırıştırılması

SDS-PAGE ile ayırıştırılacak olan proteinler jele yüklenmek üzere Tablo 3.9’da açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan protein örnekleri 70°C’de 10 dk inkübe edilerek denatüre edilmiştir. SDS-PAGE için hazır %4-12 Bis Tris jel kullanılmıştır. Elektroforez kasetlerine jeller yerleştirildikten sonra elektroforez tankı 400 ml 1X yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Jelin ilk kuyusuna 10 µl marker diğer kuyularına 40 µl protein örneği yüklenmiştir ve jel 200 V’da 30 dakika yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında jel kasetin içinden çıkartılıp blotlama aşamasına geçilmiştir.

Tablo 3.9: Protein örneklerinin hazırlanışı.

Bileşenler	Miktarı
Protein örneği	40 µg
Örnek tamponu	10 µl
Örnek indirgeyici ajan	4 µl
Ultra saf su	-
Toplam hacim	40 µl

3.11.3. Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarımı

Proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı kuru blotlama sistemi (iBlot² Dry Blotting System, Thermo Fisher Scientific) ile gerçekleştirilmiştir. Blotlama aşamasında hazır nitroselüloz

membran, bakır elektrot, jel matriks içinde doğru katot veya anot tamponu içeren dip ve üst yığınlar, filtre kağıdı, absorblama kağıdı içeren blotlama kiti kullanılmıştır.

Blotlama cihazının üzerine sırasıyla plastik tepsi içindeki dip yığın, yürütülmüş jel ve distile su kağıdı ile ıslatılmış filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Filtre kağıdı üzerinden blotlama rulosu geçilerek kabarcıklar uzaklaştırılmıştır. Filtre kağıdının üzerine absorblama pedi de yerleştirildikten sonra en üste üst yığın yerleştirilmiştir. Blotlama 20 V'da 7 dakikada gerçekleştirilmiştir.

3.11.4. Membranların Bloklanması, Primer ve Sekonder Antikorlar ile İnkübasyonu

Proteinlerin görüntülenmesi için kromojenik deteksiyon kiti kullanılmıştır. Bloklama solüsyonu kitin içinde bulunan Bloklayıcı çözücüsü A (4 ml), Bloklayıcı çözücüsü B (3 ml) ve ultrasaf su (14 ml) solüsyonları karıştırılarak hazırlanmıştır. Blotlama aşamasından sonra membranlar bloklama solüsyonu içeren kabın içine alınıp 30 dakika karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından bloklama solüsyonu boşaltılıp 20 ml distile su ile membranlar 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Bu aşama 2 defa tekrarlanmıştır. Primer antikorlar çalışmadan hemen önce, primer antikor seyreltici solüsyonu içinde ACTB; 1/1000, TYR ;1/50, TYRP1; 1/50, TYRP2; 1/100; MITF; 1/50 konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Yıkama aşamasından sonra membranlar, 10 ml primer antikor çözeltisi içine alınıp 4°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, antikor çözeltisi uzaklaştırılıp membranlar 20 ml antikor yıkama çözeltisi ile 5 dakika karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda çözelti dökülmüştür. Bu aşama 4 defa tekrarlanmıştır. Son yıkamadan sonra antikor yıkama solüsyonu uzaklaştırılıp membranın bulunduğu petriye 10 ml sekonder antikor solüsyonu eklenmiş ve membranlar 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırılıp membranlar, 10 ml antikor yıkama solüsyonu içinde 5'er dakika 4 defa yıkanmıştır.

3.11.5. Kromojenik Substrat ile İnkübasyon ve Proteinlerin Görüntülenmesi

Membranlar, antikor yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra 20 ml ultra saf su içinde 2'şer dakika karıştırılarak 2 defa yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra petri içinde bulunan membranların üzerine 5 ml kromojenik substrat eklenerek membranlar karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bant oluşumu gözlendikten sonra substrat solüsyonu dökülüp membranlar 20 ml su içinde 2 dakika boyunca yıkanmıştır. Yıkama sonrası membranlar kurutulup fotoğraflanmıştır.

3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

In vitro sitotoksosite, melanin içerik, tirozinaz aktivite ve RT-qPCR deneylerinin istatistiksel analizinde Graphpad Prism (8.3 versiyon) programı kullanılmıştır. Analizlerde One-Way ANOVA ve Tukey's testi uygulanmıştır. Anlamlılık seviyesi $p<0,05$ olarak değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. *IN VITRO* SOYA FİDELERİNİN ELDE EDİLMESİ

Sterilize edilen soya tohumları, çimlendirme için MS besin ortamı içeren kavanozlara alındıktan sonra karanlıkta $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Tohumların 3-4 gün içerisinde çimlenmeye başladığı gözlenmiştir. Çimlenen soya tohumları *in vitro* fidelerin gelişimi için fotoperiyot uygulanan iklimlendirme odasında inkübe edilmiştir. 10-14 gün içinde gelişen *in vitro* bitkilerin gövde eksplantları kallus eldesi için kullanılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Soya tohumlarından gelişen *in vitro* fidelerin görüntüsü.

4.2. *IN VITRO* SOYA FİDELERİNDEN KALLUS ELDE EDİLMESİ

Kallus uyarımı için, soya fideleri aseptik koşullar altında bistüri ve pens yardımıyla yaralandıktan sonra bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarına yerleştirilmiştir. Kallus uyarımı için farklı oranlarda bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları içeren 26 farklı (G1-G26) besin ortamına 3'er tekrarlı olacak şekilde eksplant girişi yapılmıştır. Eksplantlar, karanlıkta $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Eksplantlar günlük olarak gözlemlenmiştir ve yaklaşık 10-14 gün içinde kallusların oluşmaya başladığı belirlenmiştir. Elde edilen kalluslar 4 haftalık periyotlarda taze besin ortamına alınmıştır.

Bitki büyüme düzenleyicisi olarak yalnızca 2,4 D bulunan ortamlar (G6 ve G8), yalnızca NAA bulunan ortamlar (G1 ve G3), NAA ve BAP kombinasyonları bulunan (G2, G4 ve G5), 2,4 D ve BAP kombinasyonu bulunan (G7, G9, G10, G14, G15, G18 ve G19), 2,4 D ve kinetin bulunan (G11, G12, G13, G16, G17, G20 ve G21), NAA ve Kinetin kombinasyonu bulunan (G22, G23, G24, G25 ve G26) olmak üzere 26 farklı besin ortamında soya eksplantlarının kallus

oluşumu gözlenmiştir. Denemeler 3 farklı zamanda tekrarlanmıştır. Kallus uyarım ortamına alınan soya gövde eksplantları 4 haftalık periyotlarda taze besin ortamına aktarılmıştır. Alt kültür aşamasında tüm ortamlardaki kallusların yanıtları gözlemlenmiştir.

Deneme ortamları içerisinde NAA (yalnızca) içeren ortamlarda soya gövde eksplantlarında kök oluşumu gözlenirken NAA+BAP içeren ortamlarda nodüler kallus ve sert kallus uyarımı gözlenmiştir. NAA+Kinetin kombinasyonları da soya eksplantlarında nodüler ve sert kallus oluşumunu uyarmıştır. Düşük miktarda 2,4 D ve BAP kombinasyonları içeren besin ortamlarında ise az miktarda yumuşak kallus, yarı sert kallus, daha yüksek 2,4 D (2 mg/L) ve BAP (0,5 mg ve 1 mg/L) içeren besin ortamlarında nodüler kalluslar elde edilmiştir. 2,4 D ve Kinetin kombinasyonlarının tamamında sert kallus oluşumu gözlenmiştir. Yalnızca 2,4 içeren ortamlarda yarı sert (0,5 mg/L 2,4) ve yumuşak kalluslar (1 mg/ml 2,4 D) elde edilebilmiştir (Tablo 4.1).

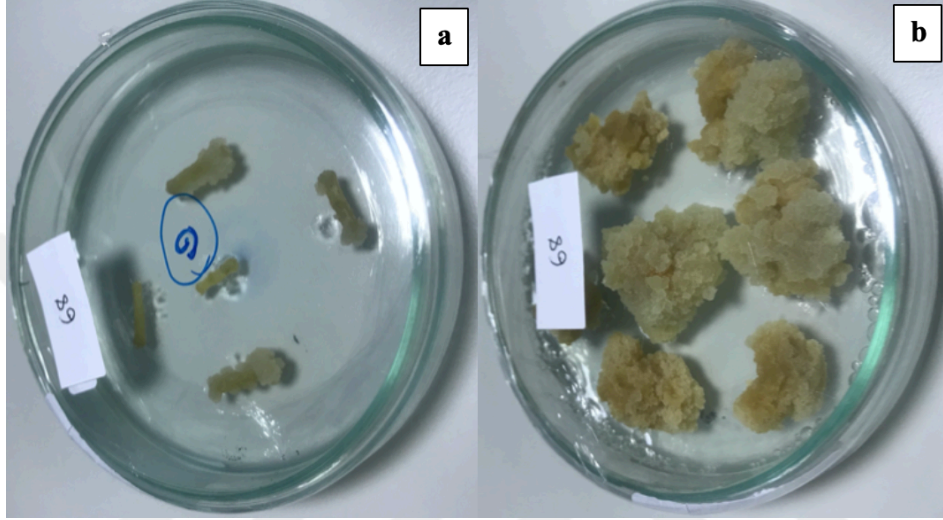
Tablo 4.1: Farklı kombinasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında gözlenen kallus yanıtları.

Besin Ortam Adı	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)				Kallus Yanıtı
	2,4 D	NAA	BAP	Kinetin	
G1	-	0,5	-	-	Kök gelişimi
G2	-	0,5	0,25	-	Az miktarda nodüler kallus
G3	-	1	-	-	Kök gelişimi
G4	-	1	0,25	-	Nodüler kallus gelişimi
G5	-	1	0,5	-	Sert, sıkı kallus gelişimi
G6	0,5	-	-	-	Az miktarda yarı sert kallus
G7	0,5	-	0,25	-	Yarı sert kallus gelişimi
G8	1	-	-	-	Yumuşak kallus gelişimi

Tablo 4.1 (devam): Farklı kombinasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında gözlenen kallus yanıtları).

G9	1		0,25	-	Az miktarda yumuşak kallus gelişimi
G10	1	-	0,5		Az miktarda yumuşak kallus gelişimi
G11	0,5	-	-	0,25	Sert kallus yanıtı
G12	1	-	-	0,25	Sert kallus yanıtı
G13	1	-	-	0,5	Sert kallus yanıtı
G14	1,25	-	0,25	-	Nodüler kallus yanıtı
G15	1,25	-	0,5	-	Nodüler kallus yanıtı
G16	1,25	-	-	0,25	Sert kallus yanıtı
G17	1,25	-	-	0,5	Sert kallus yanıtı
G18	2	-	0,5	-	Nodüler kallus yanıtı
G19	2	-	1	-	Nodüler kallus yanıtı
G20	2	-	-	0,5	Sert kallus yanıtı
G21	2	-	-	1	Sert kallus yanıtı
G22	-	0,5	-	0,25	Kallus yanıtı yok
G23	-	1	-	0,25	Nodüler kallus yanıtı
G24	-	1	-	0,5	Nodüler kallus yanıtı
G25	-	1,25	-	0,25	Nodüler kallus yanıtı
G26	-	1,25	-	0,5	Sert kallus yanıtı

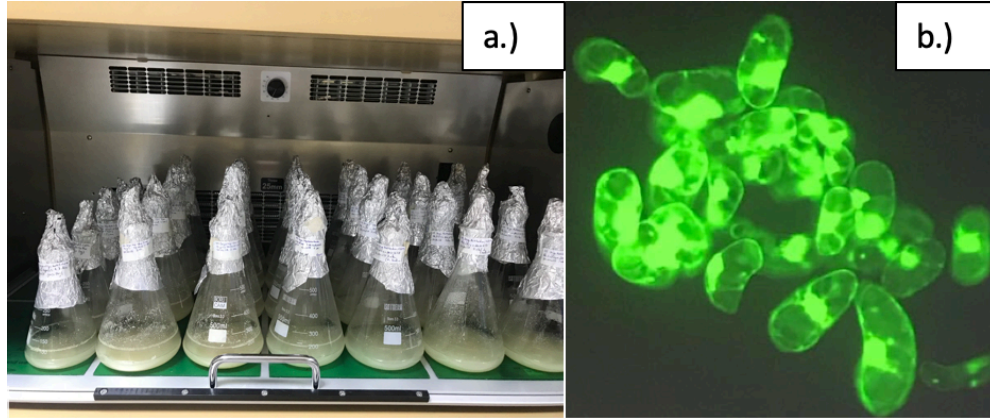
Ortamlar arasında en iyi yanıtlar yalnızca 2,4 D içeren besin ortamlarında belirlenmiştir. Oluşan kalluslar arasında en kırılğan, süspanse olabilen formda kalluslar, 1 mg/L 2,4D, %3 süktroz içeren MS ortamında elde edilmiştir (Şekil 4.2). Bundan dolayı süspanسیون kültürlerinin oluşturulmasında da aynı besin ortamının sıvı formu kullanılmıştır.



Şekil 4.2: *In vitro* soya fidelerinin gövde eksplantlarından G8 besin ortamında elde edilen kallusların görüntüsü. a.) 14 günlük kalluslar b.) 60 günlük kalluslar.

4.3. SOYA HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI

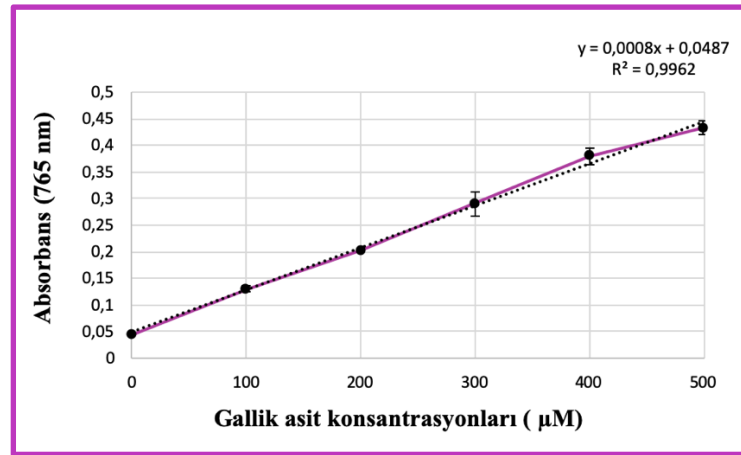
Kırılğan formdaki soya kallusları 1mg/L 2,4 D, %3 süktroz içeren sıvı MS ortamına alınarak çalkalayıcı üzerinde 110 rpm’de ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 20 gün içinde süspanse olan soya hücreleri 14 günlük periyotlarda alt kültüre alınmıştır. Alt kültürlerde hücrelerin %PCV değerleri ve FDA yöntemi ile canlılıkları analiz edilmiştir (Şekil 4.3). Soya eksplantlarından elde edilen kalluslardan farklı zamanlarda yeni süspanسیون girişleri yapılmıştır. Süspanسیونlar içinde PCV oranı %60 ve üzeri olan ve canlılıkları %95-97 oranında olan hatlar ile çalışmalara devam edilmiştir.



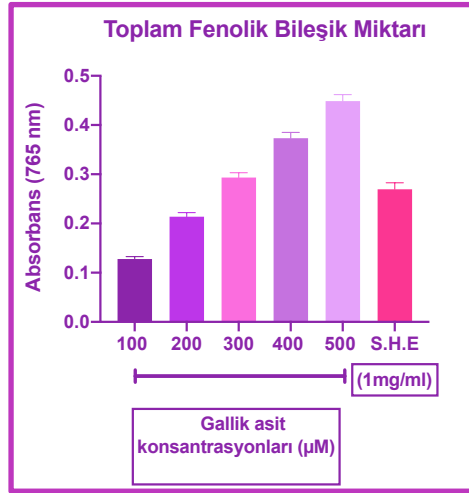
Şekil 4.3: Soya hücre süspansiyonlarının görüntüsü. a.) Soya gövde eksplantlarından elde edilen süspansiyonların inkübasyonu, b.) Soya süspansiyon hücrelerinin FDA boyaması ile floresans mikroskop görüntüleri (40x).

4.4. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK MİKTARININ BELİRLENMESİ

Soya hücre ekstraktındaki (S.H.E) toplam fenolik bileşik miktarı Folin Colteu yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstraktaki toplam fenolik bileşik konsantrasyonunun hesaplanabilmesi için gallik asitin farklı dozları ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 4.4). Regresyon eşitliği kullanılarak 1mg/ml ekstraktaki toplam fenolik bileşik miktarı $275 \pm 13,3 \mu\text{M}$ gallik asit eşdeğeri diğer bir ifadeyle $46,8 \pm 0,9 \text{ mg GA/g}$ ekstrakt (gram ekstrakttaki miligram gallik asit miktarı) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4: Gallik asit konsantrasyonlarına bağlı elde edilen standart eğri grafiği.



Şekil 4.5: Soya hücre ekstraktının içerdiği gallik asit eşdeğeri toplam fenolik bileşik miktarı.

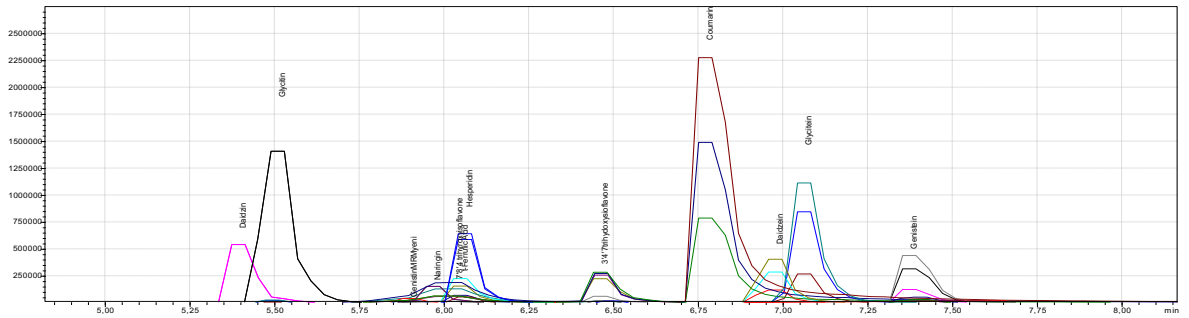
4.5. SOYA HÜCRE EKSTRAKTINDAKİ FENOLİK BİLEŞİKLERİN LC-MS/MS ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

Soya hücre ekstraktında analiz edilmek üzere 12 farklı fenolik bileşiğin LC-MS/MS cihazında optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her bir standartın Q3 tarama sonucunda iyonlaşma durumu (pozitif veya negatif) belirlendikten sonra ürün iyon taraması yapılarak moleküle özgü spesifik ürün fragmentleri bulunmuştur. Bu çalışmalar sonucunda belirlenmiş olan her bir fenolik bileşiğe ait MRM geçişleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

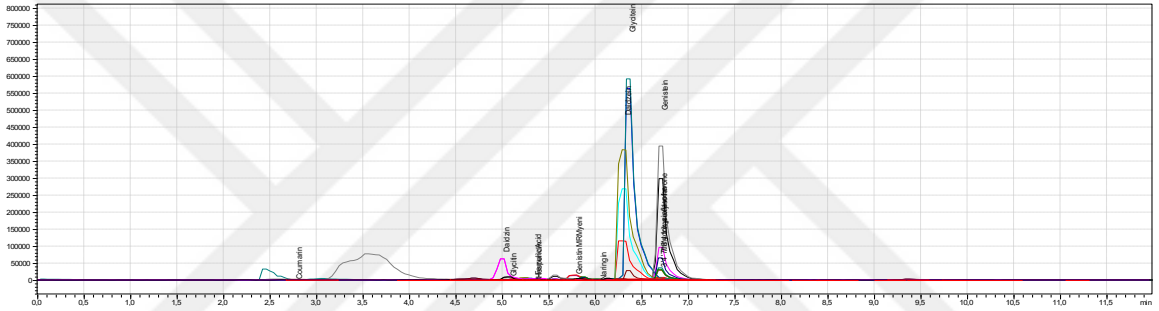
Tablo 4.2: Fenolik bileşiklerin MRM geçişleri.

Fenolik Bileşik Adı	Moleküler Ağırlık	İyonlaşma Durumu	Ana İyon	Fragment1	Fragment2
3'4'7' trihidroksiizoflavon	270,24	Negatif	269	213	226
7'8'4' trihidroksiizoflavon	270,24	Negatif	269	169	213
Daidzein	254,2	Negatif	253	208	195
Genistein	270,24	Negatif	269	133	159
Genistin	432,38	Negatif	431	266	-
Glisitein	284,26	Negatif	283	268	240
Glisitin	446,4	Pozitif	447	285	-
Daidzin	416,28	Pozitif	417	255	-
Naringin	580,83	Negatif	579	271	-
Hesperidin	610,56	Pozitif	611	303	413
Ferulik asit	194,18	Negatif	193	178	134
Kumarin	146,14	Pozitif	147	103	91

MRM geçişleri belirlendikten sonra standartların LC-MS/MS cihazının MRM modu ile optimizasyonları tamamlanmıştır. MRM optimizasyonu tamamlanan standartlar için oluşturulan metot ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Standart kalibrasyon eğrisinde kullanılan fenolik bileşiklerin toplam iyon kromatogramı Şekil 4.6'de gösterilmiştir.

**Şekil 4.6:** Standart fenolik bileşiklerin toplam iyon kromatogramı.

Soya hücre ekstraktında LC-MS/MS analizleri sonucunda hesperidin, 3'4'7 trihidroksiizoflavon, daidzein, genistein, glisitein, genistin, glisitin, daidzin, 7,8,4'-trihidroksiizoflavon, naringin ve kumarin belirlenmiştir (Şekil 4.7). Soya hücre ekstraktında major bileşik olarak, en yüksek miktarda daidzein (1397, 95 ppb) bulunmuştur. Daidzein'i miktar olarak sırasıyla genistein (975,51 ppb), glisitein (879, 68 ppb), genistin (211,02 ppb), daidzin (186,03), 3'4'7 trihidroksiizoflavon (162 ppb), 7,8,4'-trihidroksiizoflavon (121,75 ppb), hesperidin (19,58 ppb), glisitin (11,69 ppb), naringin (1,19 ppb) ve kumarin (0,68 ppb) izlemiştir. Soya hücre ekstraktında daidzein, genistein ve glisitein major bileşik olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4.7: Soya hücre ekstraktının toplam iyon kromatogramı.

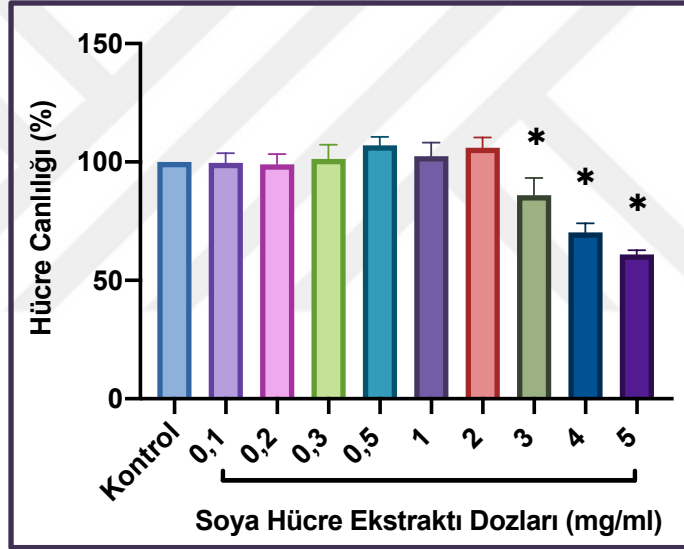
Tablo 4.3: LC-MS/MS analizleri sonucunda soya hücre ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (N.D: madde bulunamadı).

Fenolik Bileşik	Konsantrasyonu (ppb)
Glisitin	11,69±1,15
Daidzin	186,03±19
Hesperidin	19,58±1,3
3,4,7'-trihidroksiizoflavon	162±0,05
7,8,4'-trihidroksiizoflavon	121,75±14,5
Daidzein	1397,95±39,3
Genistein	975,51±162
Glisitein	879,68±24,4
Naringin	1,19±0,45
Ferulik asit	N.D
Genistin	211,02±18,5
Kumarin	0,68±0,05
Toplam	3967,1±310

4.6. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ B16-F10 FARE MELANOMA HÜCRELERİNİN CANLILIĞINA ETKİSİ

Soya hücre ekstraktının 0,1, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/ml konsantrasyonları ile 48 saat inkübe B16-F10 fare melanoma hücrelerinin canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Mikroplaka cihazı ile yapılan okumalar sonucunda elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları kullanılarak hücrelerin canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır.

Soya hücre ekstraktı konsantrasyonlarının 3 mg/ml' ye kadar B16-F10 melanoma hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Ancak ekstraktın 3 mg/ml ve üzerindeki dozlarında sitotoksik etki gözlenmiştir. Çözücü kontrol grubuna kıyasla 3 mg/ml %14, 4 mg/ml %30 ve 5 mg/ml dozu ise %39 oranında hücre canlılığını azaltmıştır (Şekil 4.8).



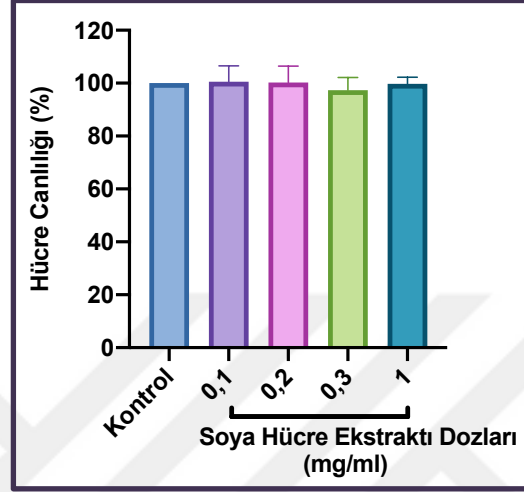
Şekil 4.8: Soya hücre ekstraktının B16-F10 fare melanoma hücrelerinin canlılığına etkisi (*: Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p < 0,001$).

Soya hücre ekstraktının sitotoksik olmayan 1mg/ml ve altındaki konsantrasyonları *in vitro* etkinlik testlerinde kullanılmıştır.

4.7. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ İNSAN NORMAL DERMAL FİBROBLAST HÜCRELERİNİN CANLILIĞINA ETKİSİ

Soya hücre ekstraktının normal hücrelerin canlılığına etkisi, insan normal dermal fibroblast hücrelerinde (CRL-2076) MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Soya hücre ekstraktının, B16-F10 fare melanoma hücrelerinde sitotoksik etki göstermeyen konsantrasyonları fibroblast hücrelerinin sitotoksikite deneylerinde kullanılmıştır. Deneyler sonucunda ölçülen absorbans

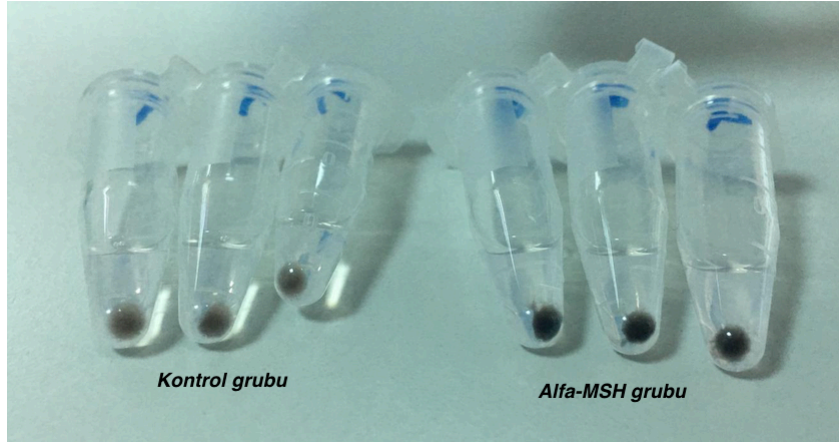
değerlerinin ortalaması alınarak hücrelerin % canlılık denklemi ile canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. Değerlendirmeler sonucunda soya hücre ekstraktının kullanılan konsantrasyonlarının insan normal dermal fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksikite göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Soya hücre ekstraktının CRL-2076 insan normal fibroblast hücrelerinin canlılığına etkisi.

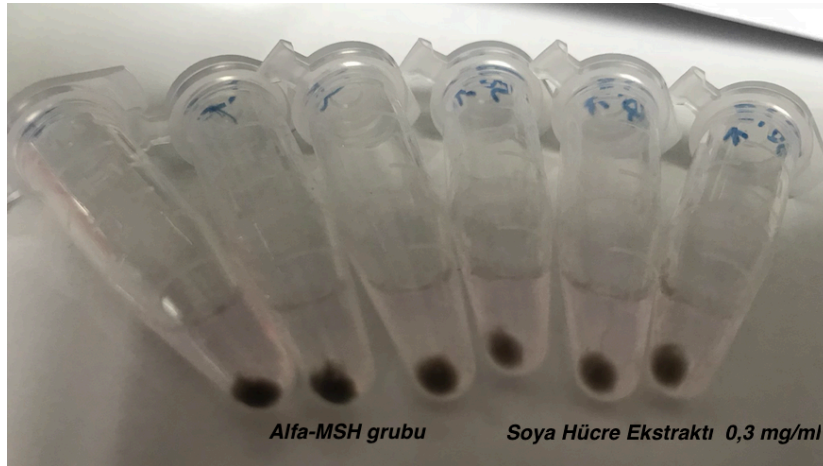
4.8. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ *IN VİTRO* MELANİN İÇERİĞİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Soya hücre ekstraktının B16-F10 fare melanoma hücrelerindeki melanin sentezine etkisi *in vitro* melanin içeriği testi ile belirlenmiştir. Hücreler *in vitro* melanin içerik testi için plakalara ekildikten bir gün sonra melanogenez uyarımı için 100 nm α -MSH ile 24 saat inkübe edilmiştir. α -MSH uyarımını takiben hücreler kojik asit ve soya hücre ekstraktı dozları ile kontrol grubu ise yalnızca taze kültür medyumunu ile 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücrelerden kültür ortamı uzaklaştırılmıştır ve hücreler santrifüj edilerek pelletleri santrifüj ile çöktürülmüştür. α -MSH uyarımı yapılmayan hücreler ile kıyaslandığında α -MSH uyarımı yapılan hücre pelletlerinin renginin melanin sentezine bağlı olarak belirgin oranda koyu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10).

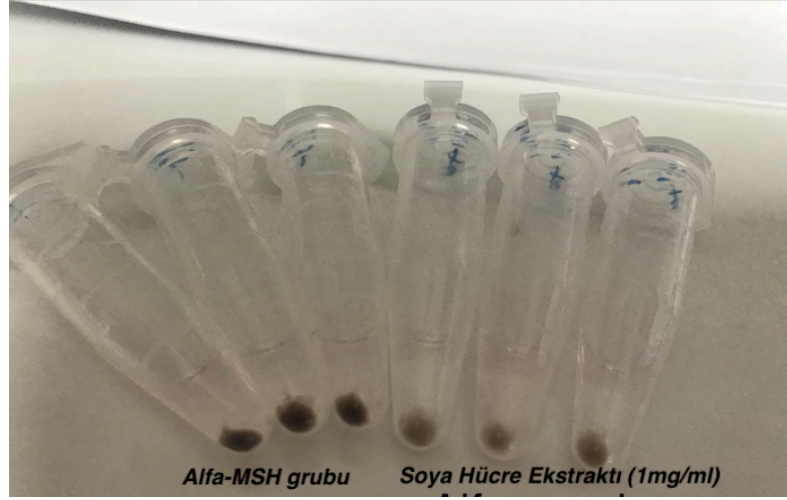


Şekil 4.10: İnkübasyon süreleri tamamlanmış α -MSH uyarımı yapılan (Alfa-MSH grubu) ve yapılmayan hücrelerin (kontrol grubu) pelletlerinin görüntüsü.

Yalnızca α -MSH uyarımı yapılan hücrelerin pelletleri ile α -MSH uyarımını takiben soya hücre ekstraktının 0,3 mg/ml ve 1 mg/ml konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edilen hücrelerden elde edilen pelletler kıyaslandığında melanin sentezine bağlı olarak soya hücre ekstraktı konsantrasyonu arttıkça pellet renginin açıldığı belirlenmiştir. Soya hücre ekstraktının 1 mg/ml dozunun B16-F10 melanoma hücrelerinde melanin sentezini önemli derecede baskıladığı görsel olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

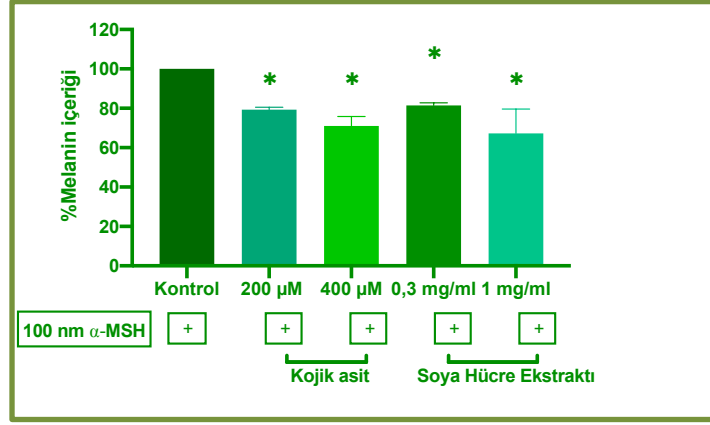


Şekil 4.11: Yalnızca α -MSH uyarımı yapılan (Alfa-MSH grubu) hücrelerin ve α -MSH uyarımından sonra soya hücre ekstraktının 0,3 mg/ml konsantrasyonu ile inkübe edilen hücrelerin pellet görüntüsü.



Şekil 4.12: Yalnızca α -MSH uyarımı yapılan (Alfa-MSH grubu) hücrelerin ve α -MSH uyarımından sonra soya hücre ekstraktının 1 mg/ml konsantrasyonu ile inkübe edilen hücrelerin pellet görüntüsü.

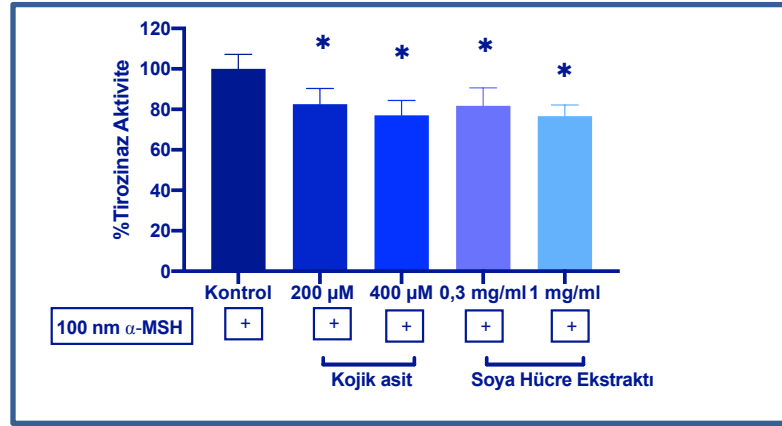
Spektrofotometrik olarak melanin içeriğini belirlemek üzere elde edilen hücre pelletleri NaOH içinde 80°C’de çözündürülmüştür. Hücre pelleti içindeki melanine bağlı oluşan absorbanlar kullanılarak melanin içerik yüzdeleri elde edilmiştir. Kontrol grubuna (yalnızca α -MSH uygulanan) kıyasla soya hücre ekstraktının 0,3 mg/ml dozu %19,6, 1 mg/ml dozunun %33,8 oranında melanin içeriğini azalttığı belirlenmiştir. Pozitif kontrol olan kojik asitin ise 200 μ M dozu %21,7, 400 μ M dozu ise %29 oranında melanin içeriğini azaltmıştır. Soya hücre ekstraktının doza bağlı olarak melanin içeriğini azalttığı gözlenirken, melanin içeriğine etkileri bakımından soya hücre ekstrakt dozları ile kojik asit dozları arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Soya hücre ekstrakt ve kojik asit konsantrasyonlarının B16-F10 fare melanoma hücrelerinin melanin içeriğine etkisi (*: Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p<0,001$).

4.9. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ *İN VİTRO* ANTİ-TİROZİNAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Soya hücre ekstraktı ve kojik asit konsantrasyonlarının anti-tirozinaz aktivitesi B16-F10 melanoma hücrelerinde *in vitro* anti-tirozinaz aktivite testi ile belirlenmiştir. Hücreler *in vitro* anti-tirozinaz aktivite testi için plakalara ekildikten bir gün sonra melanogenez uyarımı için 100 nm α-MSH ile 24 saat inkübe edilmiştir. α-MSH uyarımını takiben hücreler kojik asit ve soya hücre ekstraktı dozları ile kontrol grubu ise yalnızca taze kültür medyumunu ile 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücre lizatlarının L-DOPA ile inkübasyonu sonrasında oluşan dopakrom spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ile tirozinaz aktivite yüzdeleri belirlenmiştir (Şekil 4.14).

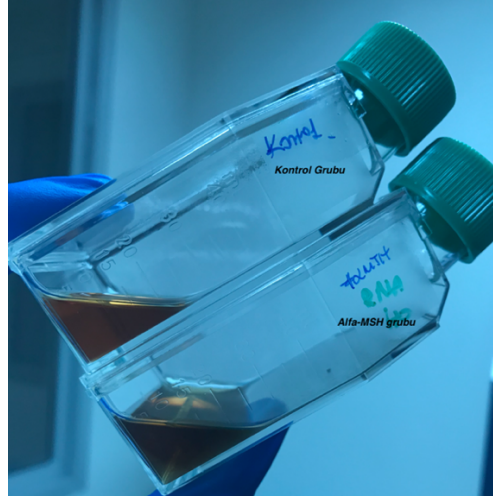


Şekil 4.14: Soya hücre ekstraktı ve kojik asit konsantrasyonlarının B16-F10 fare melanoma hücrelerinde tirozinaz aktiviteye etkisi (*: Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p<0,001$).

B16-F10 melanoma hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla soya hücre ekstraktının 0,3 mg/ml dozunun %19,3 oranında, 1 mg/ml dozunun %24,4 oranında anti-tirozinaz aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Pozitif kontrol olan kojik asitin ise 200 µM dozu %18,4, 400 µM dozu ise %23,9 oranında anti-tirozinaz aktivite göstermiştir. Soya hücre ekstraktının doza bağlı olarak anti-tirozinaz aktivite gösterdiği belirlenirken, anti-tirozinaz aktivite oranları bakımından soya hücre ekstrakt dozları ile kojik asit dozları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

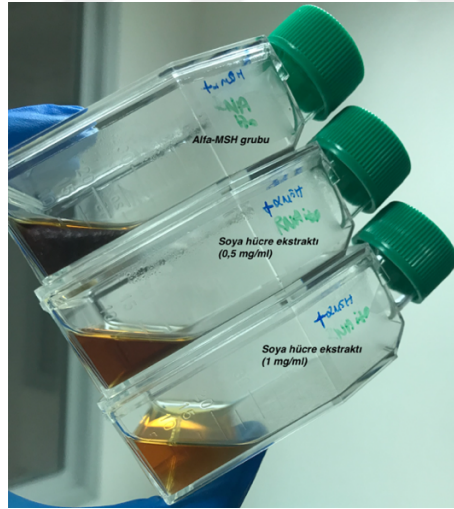
4.10. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ TİROZİNAZ İLİŞKİLİ GENLERİN İFADESİNE ETKİSİNİN RT-QPCR ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

Hücreler gen ifade analizleri için kültür kaplarına ekildikten bir gün sonra melanogenez uyarımı için kontrol grubu hariç tüm hücre grupları 100 nm α -MSH ile 24 saat inkübe edilmiştir. α -MSH uyarımını takiben hücreler soya hücre ekstraktı dozları ile kontrol ve α -MSH grubu ise yalnızca taze kültür medyumunu ile 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlanan hücreler RNA izolasyonundan önce gözlemlenmiştir. α -MSH uyarımı yapılmayan hücelere kıyasla yalnızca α -MSH uyarımı yapılan hücrelerinin melanin sentezine bağlı olarak medyumunun renginin koyulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: α -MSH uygulanmayan (kontrol grubu) ve α -MSH ile uyarılan (Alfa-MSH grubu) hücrelerinin RNA izolasyonu öncesindeki medyum görüntüsü.

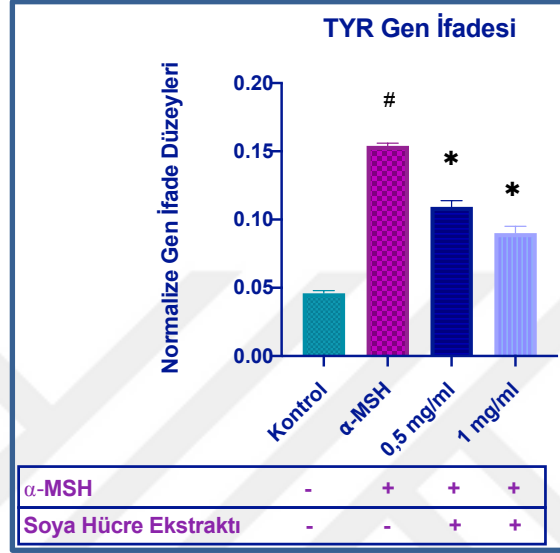
Yalnızca α -MSH uyarımı yapılan hücelere kıyasla soya hücre ekstraktının 0,3 mg/ml ve 1 mg/ml konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edilen hücrelerin konsantrasyon arttıkça melanin sentezinin baskılanmasına bağlı olarak medyum renginin açıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: α -MSH ile uyarılan (Alfa-MSH grubu) ve soya hücre ekstraktı (0,5 mg/ml ve 1 mg/ml) uygulanan hücrelerin RNA izolasyonu öncesindeki medyum görüntüsü.

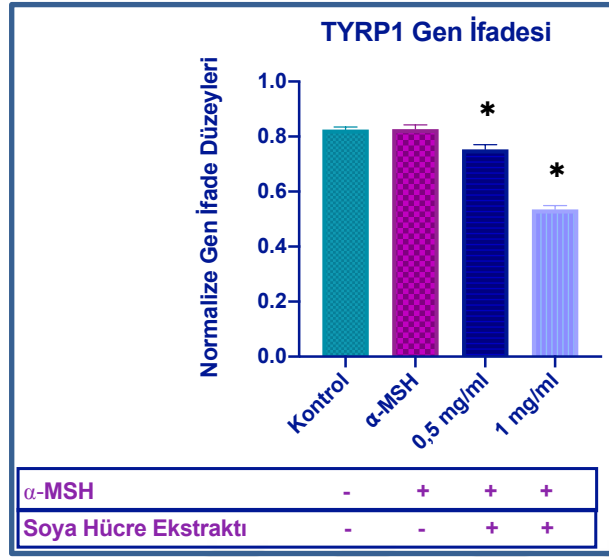
Hücrelerden RNA izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen cDNA ile TYR, TYRP1, TYRP2 ve MITF genlerinin ifade seviyeleri RT-qPCR ile analizleri ile belirlenmiştir.

TYR gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla α -MSH uyarımı yapılan hücrelerde 3,3 kat arttığı, yalnızca α -MSH uyarımı yapılan hücrelere kıyasla ise soya hücre ekstraktının 0,5 mg/ml dozu uygulanan hücrelerde 1,4 kat, 1 mg/ml dozu uygulanan hücrelerde ise 1,7 kat oranında azaldığı belirlenmiştir. TYR gen ifade değerleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



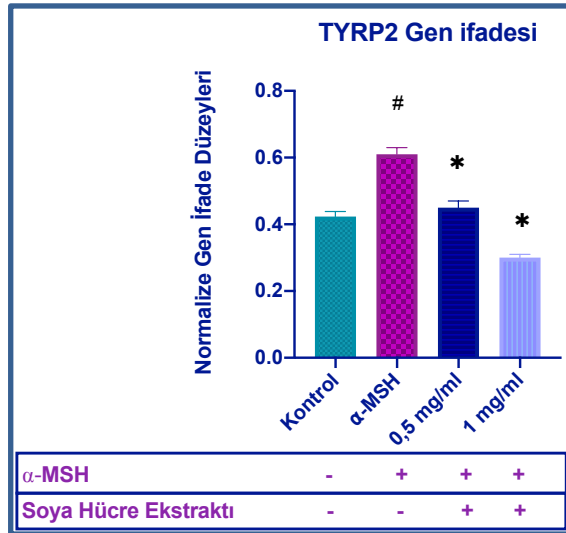
Şekil 4.17: Soya hücre ekstraktının B16-F10 melanoma hücrelerinde TYR gen ifadesi üzerine etkisi (*: α -MSH grubuna göre anlamlılığı, #: kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p < 0,001$).

TYRP1 gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla α -MSH uyarımı yapılan hücrelerde değişmediği, yalnızca α -MSH uyarımı yapılan hücrelere kıyasla ise soya hücre ekstraktının 0,5 mg/ml dozu uygulanan hücrelerde 1,1 kat ve 1 mg/ml dozu uygulanan hücrelerde 1,5 kat azaldığı belirlenmiştir. TYRP1 gen ifade değerleri Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Soya hücre ekstraktı doza bağlı olarak B16-F10 melanoma hücrelerinde TYRP1 geninin ifadesini baskılamıştır.



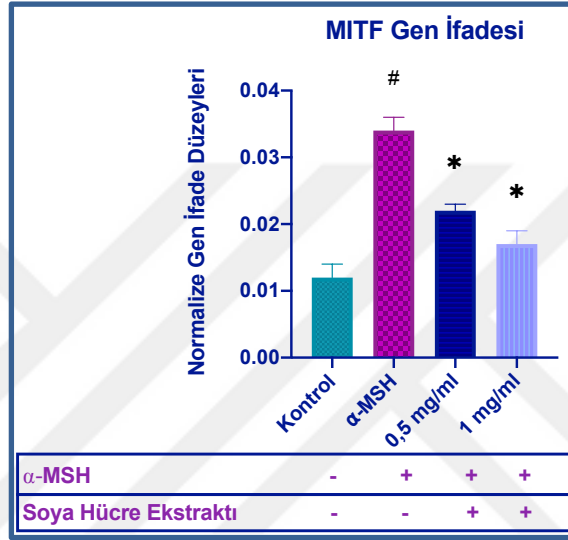
Şekil 4.18: Soya hücre ekstraktının B16-F10 melanoma hücrelerinde TYRP1 gen ifadesi üzerine etkisi (*: α -MSH grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p < 0,001$).

TYRP2 gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla α -MSH uyarımı yapılan hücrelerde 1,5 kat arttığı, yalnızca α -MSH uyarımı yapılan hücelere kıyasla ise soya hücre ekstraktının 0,5 mg/ml dozu uygulanan hücrelerde 1,3 kat ve 1 mg/ml dozu uygulanan hücrelerde 2 kat azaldığı belirlenmiştir. TYRP2 gen ifade değerleri Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Soya hücre ekstraktı doza bağlı olarak B16-F10 melanoma hücrelerinde TYRP2 geninin ifadesini baskılamıştır.



Şekil 4.19: Soya hücre ekstraktının B16-F10 melanoma hücrelerinde TYRP2 gen ifadesi üzerine etkisi (*: α -MSH grubuna göre anlamlılığı, #: kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p < 0,001$).

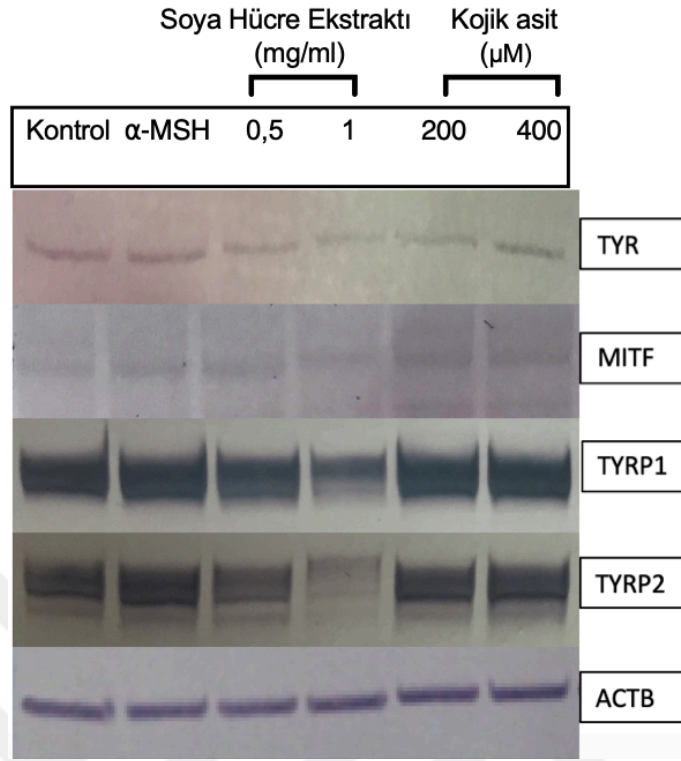
MITF gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla α -MSH uyarımı yapılan hücrelerde 2,8 kat arttığı, yalnızca α -MSH uyarımı yapılan hücrelere kıyasla ise soya hücre ekstraktının 0,5 mg/ml dozu uygulanan hücrelerde 1,5 kat ve 1 mg/ml dozu uygulanan hücrelerde 2 kat azaldığı belirlenmiştir. MITF gen ifade değerleri Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Soya hücre ekstraktı doza bağlı olarak B16-F10 melanoma hücrelerinde MITF geninin ifadesini baskılamıştır. MITF gen ifade düzeyleri Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



Şekil 4.20: Soya hücre ekstraktının B16-F10 melanoma hücrelerinde MITF gen ifadesi üzerine etkisi (*: α -MSH grubuna göre anlamlılığı, #: kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir, $p < 0,001$).

4.11. SOYA HÜCRE EKSTRAKTININ TİROZİNAZ İLİŞKİLİ PROTEİNLERİN İFADESİNE ETKSİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Hücreler protein ifade analizleri için kültür kaplarına ekildikten bir gün sonra melanogenez uyarımı için kontrol grubu hariç tüm hücre grupları 100 nm α -MSH ile 24 saat inkübe edilmiştir. α -MSH uyarımını takiben hücreler soya hücre ekstraktı ve kojik asit dozları ile kontrol ve α -MSH grubu ise yalnızca taze kültür medyumunu ile 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonra izole edilen proteinler ile Western blot analizleri yürütülmüştür. Western blot analizi sonucunda elde edilen bant görüntüsü Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21: Soya hücre ekstraktı ve kojik asit konsantrasyonlarının melanogenez ilişkili proteinlerin ifadesine etkisi.

Protein normalizasyonu için analiz edilen ACTB (beta-aktin) proteininin tüm uygulamalarda aynı oranda ifade edildiği gözlenmiştir.

Kontrol grubuna kıyasla yalnızca α -MSH uygulaması yapılan TYR proteininin ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Yalnızca α -MSH uygulaması yapılan gruba kıyasla soya hücre ekstraktı ve kojik asit konsantrasyonlarının TYR proteinin ifadesini azalttığı belirlenmiştir. Özellikle soya hücre ekstraktının 1 mg/ml dozunu TYR protein ifadesini belirgin şekilde baskıladığı gözlenmiştir.

MITF protein bantları çok belirgin halde elde edilememesine rağmen yalnızca α -MSH uygulaması yapılan hücrelere kıyasla 1 mg/ml soya hücre ekstraktı uygulanan hücrelerde ifadesinin baskılandığı gözlenmiştir. α -MSH grubuna kıyasla kojik asit dozlarında ise MITF protein ifade seviyesinde herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir.

TYRP1 proteinin kontrol grubunda yoğun şekilde ifade edildiği, buna rağmen α -MSH grubunda kontrol grubuna kıyasla ifadenin bir miktar arttığı gözlenmiştir. Soya hücre ekstraktının özellikle 1 mg/ml dozunda TYRP1 protein ifadesinin oldukça bariz şekilde baskılandığı belirlenmiştir. Kojik asit dozlarında ise TYRP1 protein ifadesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir.

TYRP2 proteinin kontrol grubunda yoğun şekilde ifade edildiği, buna rağmen α -MSH grubunda kontrol grubuna kıyasla ifadenin bir miktar arttığı gözlenmiştir. Soya hücre ekstraktının 0,5 mg/ml ve 1 mg/ml dozlarının doza bağlı şekilde TYRP2 proteinin ifadesini azalttığı belirlenmiştir. Bunun yanında kojik asit dozları TYRP2 proteinin ifadesinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Derinin rengini belirleyen ana bileşen olan melaninin temel görevi deriyi UV radyasyonunun zararlı etkilerinden korumaktır (Chan ve diğ., 2011). Buna rağmen melaninin fazla miktarda üretimi çil, melazma, leke ve diğer hiperpigmentasyon sendromlarına neden olmaktadır (Chung ve diğ., 2018). Hiperpigmentasyona karşı en sık kullanılan hidrokinon, kojik asit, arbutin, askorbik asit ve retinoik asit gibi ajanların sitotoksikite, deri iritasyonu ve kontakt dermatit gibi zararlı yan etkileri ve stabilite, düşük etkinlik, düşük deri penetrasyonu gibi problemleri bildirilmiştir (Seo ve diğ., 2019). Bu sebeple farklı kaynaklardan yüksek etkinlik ve daha az yan etkilere sahip yeni tirozinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi ihtiyacı devam etmektedir (Masum ve diğ., 2019). Son yıllarda, artan etkinliği ve daha az yan etkisinin olmasından dolayı tamamlayıcı ve alternatif tıbbi istek artmaktadır. Çok sayıda araştırmacı doğal kaynaklardan melanin sentezini ve tirozinaz aktiviteyi baskılayabilen faydalı ajanlar tanımlamaya çalışmaktadır (Kim ve Ma., 2013).

Bu çalışmada doğal bir izoflavonoid kaynağı olan soya bitkisinin hücre kültürlerinin elde edilmesi ve soya hücre kültürü ekstraktının hiperpigmentasyon giderici ajan olma potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Soyada bulunan birçok izoflavonoid ve diğer fenolik bileşiklerin etkili anti-tirozinaz aktivitesinin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Ancak şimdiye kadar soyada bulunan tüm fenolik bileşiklerin sinerjik etkisinin melanogenez üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmayla soya hücre kültürü ekstraktının içerdiği fenolik bileşiklerin sinerjik etkisi değerlendirilmiştir.

Bitkilerin kozmetikte kullanımları, yavaş büyüme sorunları, mevsime bağlı hasat gerekliliği, içerdikleri bileşiklerin konsantrasyonunun bitkiden bitkiye ve hasattan hasata farklılık göstermesi ve fazla miktarda su kullanım ihtiyacı gibi birçok faktörden kaynaklı sınırlanmaktadır. Bitki hücre kültürü yöntemi, bitki kullanımına bağlı yaşanan bu problemlerin üstesinden gelebilmektedir. Aynı zamanda bitki hücre kültürleri, kontrollü laboratuvar şartlar altında üretim yapabilme, fazla bitki kullanıma engel olma, su kullanımı azaltma ve ekosistemi koruma gibi birçok avantaj da sağlamaktadır (Trehan ve diğ., 2017; Eibl ve diğ., 2018). Bu

sebeplerle çalışmada doğrudan soya bitkisi kullanmak yerine soya bitki hücre kültürleri elde edilmiştir.

Bunların yanında, soya hipokotil süspansiyon kültürlerinde bulunan izoflavonoid miktarının, soya tohum ekstraktında bulunan miktara kıyasla 5,8 kat fazla olduğu bildirilmiştir (Sansanelli ve diğ., 2014). Bitki hücre kültürlerinin diğer avantajlarının yanında fenolik bileşik veriminin de bitki ekstraksiyonuna göre daha fazla olmasından kaynaklı, soyadan doğrudan elde edilmiş ekstrakt yerine soya hücre kültüründen elde edilen ekstrakt çalışmalarda kullanılmıştır.

Soya hücre kültürlerinin eldesi için öncelikli olarak *in vitro* soya fidelerinden süspanse olabilen kallus elde edilmiştir. Bu amaçla farklı oksin ve sitokinin hormon kombinasyonları içeren besin ortamlarında soya gövde eksplantlarının kallus yanıtları araştırılmıştır. Kullanılan tüm ortamlar içinde en yumuşak, süspanse olabilen kallus uyarım ortamı G8 olarak kodlanan 1 mg/L 2,4 içeren MS ortamı olarak belirlenmiştir. Daha düşük miktarda 2,4 D içeren besin ortamlarında (0,5 mg/L 2,4D) daha az miktarda ve sert kallus uyarımı ve yalnızca NAA bulunan ortamlarda kök oluşumu gözlenmiştir. NAA ve BAP, NAA ve Kinetin kombinasyonlarında nodüler ve sert kallus oluşumu gözlenirken 2,4 D ve BAP kombinasyonlarında nodüler kallus uyarımı, 2,4 D ve Kinetin kombinasyonlarında ise sert kallus uyarımı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda soya gövde eksplantlarında en kırılğan ve süspanse olabilen kallus uyarımını az miktarda (1 mg/L) 2,4 D'nin sağladığı gözlenmiştir (Tablo 4.1).

Federici ve diğ., (2004) çalışmalarında, soya suşlarından kallus ve süspansiyon kültürü eldesinde 1 mg/L 2,4 içeren Gamborg B5 ortamını kullanmıştır. Sansanelli ve diğ., (2014) soya hipokotil eksplantlarından 3,3 mg/L 2,4 D ve 2,8 mg/L NAA içeren Gamborg B5 ortamında en iyi kallus yanıtını elde etmiştir. Devi ve Giridhar (2014) soya kotiledon yapraklarından 1,72 mg/L 2,4 D, 3,64 mg/L NAA ve 0,25 mg/L Kinetin içeren MS besin ortamında yumuşak ve kırılğan kallus elde ettiklerini bildirmiştir. Soya eksplantlarından kırılğan kallus uyarımı için kullanılan besin ortamlarındaki farklılıklarının çalışmalarda kullanılan soya çeşitlerinin ve eksplant tipinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmanın soya hücre kültürü elde edilmesi aşamasından sonraki aşamasında anti-melanogenez aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere soya hücre kültürlerinden %70 etanol

ile maserasyon yöntemi ile ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ekstrakttaki toplam fenolik içeriği $46,8 \pm 0,9$ mg GA/g bulunmuştur (Şekil 4.5).

Soya hipokotil süspansiyonlarında, hücre inokülasyon oranının toplam fenolik bileşik miktarına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada en fazla toplam fenolik miktarının 40 gram/L inokülasyon yapılan süspansiyonda 36,2 mg GA eşdeğeri/L olarak elde edildiği bildirilmiştir (Sansanelli ve diğ., 2014). Farklı gelişim aşamalarındaki soya tohumlarından elde edilen %80 metanol ekstraktlarında toplam fenolik miktarının 42,2 (minimum) ve 50,4 (maksimum) mg kateşin /G ekstrakt olduğu bulunmuştur (Peiretti ve diğ., 2019). 6 farklı soya çeşitinin toplam fenolik bileşik miktarının karşılaştırıldığı bir çalışmada soya çeşitlerinin toplam fenolik miktarının 2-2,6 mg GAE/g soya tohumu olduğu belirlenmiştir (Slavin ve diğ., 2009). 9 farklı Virginia soya çeşitinde toplam fenolik miktarının 2,9-3,9 mg/GA eşdeğeri/gram soya tohumu olduğu raporlandırılmıştır (Chung ve diğ., 2008).

Soyada toplam fenolik bileşik miktarlarının analiz edildiği bu çalışmalardan yalnızca birinde soya hücre kültüründe analiz yapılmıştır. Bu çalışmada da litre besin ortamına inokule edilen yaş hücrede bulunan toplam fenolik bileşik miktarı analiz edilmiş olup soya hücre kültüründen bir ekstraksiyon yapılmamıştır. Dolayısıyla soya hücre kültürü ekstraktındaki toplam fenolik bileşik miktarı hakkında bir bilgi verilmemiştir. Diğer çalışmalarda ise ekstrakt içinde ya da soya tohumlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarları değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan soya çeşitleri de çalışmamızda kullanılan soya çeşitinden farklıdır. Buna rağmen çalışmamızda Peiretti ve diğ., (2016)'nin çalışmalarında kullanılan soya tohum ekstraktında belirlenen miktara (42,2-50,4 mg kateşin/G ekstrakt) yakın miktarda toplam fenolik bileşik (46,8 mg GAE/gram ekstrakt) elde edilmiştir.

Çalışmamızda, melanin sentezi baskılayıcı ve anti-tirozinaz aktiviteleri belirlenmiş olan soya izoflavonoidleri ve diğer fenolik bileşiklerin soya hücre ekstraktındaki miktarlarının belirlenmesi için LC-MS/MS analizleri yürütülmüştür. Soya hücre ekstraktında en yüksek miktarda bulunan major izoflavonoidler; sırasıyla daidzein, genistein ve glisitein olmuştur. Bunları miktar olarak sırasıyla genistin, daidzin, 3,4,7'-trihidroksiizoflavon, 7,8,4'-trihidroksiizoflavon, hesperidin, glisitin, naringin ve kumarin bileşikleri izlemiştir. Ferulik asit ise bulunamamıştır. Analiz edilen 12 fenolik bileşiğin toplam miktarı ise 3967 ppb (3967 µg/L) olarak bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tez çalışmasına benzer şekilde soya süspansiyonlarından izoflavonoid ve fenoliklerin sıvı kromatografi sistemleri ile analizinin yapıldığı bazı çalışmalar bulunmaktadır. 4 farklı soya çeşitine ait 40 farklı kallus suşu ile yapılan bir çalışmada, kallusların izoflavonoid içeriklerinin miktar olarak hem soya çeşitine göre hem de aynı çeşitin suşlarına göre 0,1 mg/g ile 46,3 mg/g kuru ağırlık aralığında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Bu kallus suşlarından en verimli suş ile elde edilmiş süspansiyon kültürlerinin toplam izoflavonoid miktarının ise 72 mg/g kuru ağırlık olduğu belirlenmiştir. Süspansiyon kültürünün lag fazı ve büyüme fazının başlangıçlarında izoflavonoid oranlarının stabil kaldığını ve izoflavonoidlerin %70'nin malonil daidzin, %20'sinin malonil genistein ve %10'unun daidzin, genistin, daidzein ve genistein'in oluşturduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda çalışmada Maple arrow çeşitine ait 13406 numaralı suşda daidzin formlarının daha zengin olduğu (% toplam izoflavonoidin %70'i), 13407 numaralı suşda ise genistin formlarının daha fazla bulunduğu (toplam izoflavonoidin %70'i) bildirilmiştir (Federici ve diğ., 2004). Çalışmada soyanın farklı suşlarına ait kallus ve süspansiyonlarının toplam izoflavonoid miktarı karşılaştırılmış olup çalışmamızdaki gibi izoflavonoidlerin ayrı ayrı miktarsal analizlerine yer verilmemiştir. Ancak çalışmamızda belirlediğimiz izoflavonoid grubunun soya hücre süspansiyon izoflavonoidlerinin %10'luk kısmını oluşturduğu ifade edilmiştir. Çalışmada daha çok toplam izoflavonoid oranlarının kıyaslanması yapılmıştır.

Başka bir çalışmada 20, 40 ve 60 gram/L soya hipokotil hücresi olacak şekilde başlatılan süspansiyon kültürlerin 10 günlük inkübasyonu boyunca farklı günlerde daidzein, genistein, glisitein, genistin and glisitin izoflavonoidlerinin ve ferulik asitin analizleri yapılmıştır. Tüm inkübasyon süreleri sonunda yapılan analizlere göre maksimum miktarda genistein 40 gram/L süspansiyonda 1,52 mg/L olarak, maksimum miktarda daizein ise 60 gram/L süspansiyonda 3,42 mg/L olarak bulunmuştur. Genistin ve daidzin ise en fazla 40 gram/L süspansiyon içinde, genistein ve daidzein ortalama miktarından 13 kat daha az miktarda bulunmuştur. Glisitin hiçbir örnekte bulunamamışken, 60 gram/L süspansiyonda 0,025 mg/L olarak glisitein en az miktarda bulunan izoflavonoid olmuştur. Ferulik asitin ise soya süspansiyon kültürlerinde 0. gün ve 3. gün arasında miktarının giderek azaldığı, 4. ve 10.gün aralığında ise tamamen yok olduğu raporlamıştır. Bunun yanında çalışmada 3,4,7'-trihidroksiizoflavon, 7,8,4'-trihidroksiizoflavon, hesperidin, naringin ve kumarin bileşikler analiz edilmemiştir (Sansanelli ve diğ., 2014). Çalışmadaki izoflavonoid miktarları süspansiyonlara inoküle edilen yaş hücre miktarı baz alınarak ortaya konulmuştur. Aynı zamanda belirtilen inkübasyon süreleri sonunda

yaş hücre miktarlarının ne kadar arttığı bilgisine de yer verilmemiştir. Yaş hücre miktarının, çalışmada yapılan metanolik ekstraksiyon ile ne kadar ekstrakt miktarına eşdeğer olduğunun belirtilmemesinden dolayı çalışmamızla kıyaslanması çok verimli olmamıştır. Buna rağmen, bu çalışmada da tez çalışmamızda olduğu gibi genistein ve daidzein izoflavonoidleri en yüksek miktarlarda belirlenmiştir. Sansanelli ve diğ., (2014) glisitin'in hiçbir soya süspansiyon örneğinde bulunmadığını belirtirken çalışmamızda diğer izoflavonoidlere oranla daha az miktarda glisitin (11,6 ppb) bulunmuştur. Aynı zamanda çalışmada genistin ve daidzin'in daidzein ve genistein ortalama miktarından 13 kat az bulunduğu bildirilirken çalışmamızda 5,9 kat daha az miktarda belirlenmiştir. Çalışmada ferulik asitin soya süspansiyonunda 0-4. günler arasında bulunduğu ancak diğer günlerde bulunamadığı belirtilmiştir. Çalışmamızda izoflavonoidlerin miktarsal analizi 14. gündeki süspansiyonlardan elde edilen ekstraktlar ile yapıldığı için ferulik asit açısından benzer sonuca ulaşılmıştır. Tez çalışması ile diğer çalışmadaki izoflavonoid miktar farklılıkların, soya çeşitlerinin ve süspansiyon kültürleri besin ortamları içeriklerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Federici ve diğ., (2003) de 40 farklı soya suşu ile yaptıkları çalışmada suşlar arasında izoflavonoid miktarları ve çeşitlerinin değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir.

21 farklı soya çeşitinden elde edilen ekstraktlarda izoflavonoidlerin analiz edildiği bir çalışmada soya çeşitlerinin gram ekstraktında daidzein 1,7-23,5 µg, genistein 0,8-15 µg, daizin 5-96,6 µg, glisitin 5,7-37,6 µg, genistin 8,6-87 µg aralığında bulunmuştur. Bunun yanında ekstraktlarda glisitein'e rastlanmamıştır. Çalışmada bu izoflavonoidlerin yanı sıra asetil glukozitler (asetil genistin, asetil daidzin ve asetil glisitin) ve malonil glukozit (malonil genistin, malonil daidzin ve malonil glisitin) formdaki izoflavonoidlerin de miktarı belirlenmiştir. Ekstraktlardaki toplam izoflavonoid miktarı 140-1048 µg/gram ekstrakt aralığında bulunmuştur. Çalışmada kullanılan 21 farklı soya çeşitinde tüm izoflavonoidlerin miktarlarının önemli derecede farklı olduğu da belirtilmiştir (Devi ve diğ., 2018). Bu çalışmadaki en fazla toplam izoflavonoid (1,048 µg/mg ekstrakt) içeren soya çeşiti ile karşılaştırıldığında çalışmamızdaki soya hücre kültürü ekstraktında 3,8 kat daha fazla miktarda (3,986 µg/mg ekstrakt) toplam fenolik madde belirlenmiştir.

Farklı miktarlarda izoflavonoidleri içeren soya hücre ekstraktının, melanogenez üzerindeki *in vitro* etkinlik testlerine geçilmeden önce *in vitro* olarak güvenliği B16-F10 melanoma hücreleri üzerinde sitotoksikite analizleri ile incelenmiştir. Değerlendirmeler sonucunda B6-F10

melanoma hücrelerinde çözücü kontrol grubuna kıyasla soya hücre ekstraktı 3 mg/ml konsantrasyona kadar herhangi bir sitotoksosite göstermemiştir. 3 mg (%14,4 oranında azalma) ve üzeri konsantrasyonlarda ise hücrelerde canlılık azalmaya başlamış olup 4 mg/ml'de %30 ve 5 mg/ml'de %39 oranında hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).

Soya hücre ekstraktının ya da soya ekstraktının B16-F10 melanoma hücreleri üzerinde sitotoksitesine dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak soya (Glycine max, Codetex 232 variety) tohum ekstraktının A375 ve 451Lu insan melanoma hücreleri üzerinde sitotoksitesi araştırılmıştır. Çalışmada soya tohum ekstraktının A375 melanoma hücrelerinde 0-2,2 mg/ml, 451Lu melanoma hücrelerinde ise 0-1,6 mg/ml konsantrasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucundaki *in vitro* sitotoksitesi belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da kullanılan tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla sitotoksosite belirlenmemiştir (Vilela ve diğ., 2014). Vilela ve diğ., (2014)'nin çalışmalarında buldukları sonuçlara benzer şekilde çalışmamızda da soya ekstraktının 2 mg/ml'a kadar olan konsantrasyonlarında B16-F10 melanoma hücrelerinde de sitotoksosite görülmemiştir (Şekil 4.9).

Çalışmamızda soya hücre ekstraktının melanoma hücreleri dışında normal bir hücredeki sitotoksitesinin de değerlendirilmesi için insan normal dermal fibroblast hücreleri (CRL-2076) kullanılmıştır. Bu hücrelerde ise soya hücre ekstraktının 0-1 mg/ml konsantrasyonlarının sitotoksitesi araştırılmıştır ve tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla herhangi bir toksisite belirlenmemiştir.

Cho ve diğ., (2019) %70 etanolik soya ekstraktının 0-0,2 mg/ml konsantrasyonlarının Hs68 insan fibroblastlarındaki 24 saat inkübasyon sonrasındaki sitotoksitesini değerlendirmiştir. Buna göre ekstraktın 0,2 mg/ml dozunun hücrelerde canlılığın azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada soya ekstraktının daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermesinin ekstrakt içerik farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda kullanılan ekstraktın Cho ve diğ., (2019)'nin çalışmasındaki gibi direkt soyadan değil soyanın hücre kültüründen elde edilmesinin ve kullanılan soya çeşitlerinin farklılığının ekstraktların içeriğindeki fenoliklerin çeşit ve miktarlarının değişimine neden olabileceği düşünülmüştür.

Soya hücre ekstraktının hem fare melanoma hücreleri (B16-F10) hem de insan normal dermal fibroblast hücreleri (CRL-2076) üzerinde sitotoksik etkisi olmayan dozlarının *in vitro* etkinlik testlerinde kullanılmasına karar verilmiştir. *In vitro* melanin içeriği deney sonuçlarına göre B16-F10 melanoma hücrelerinde, α -MSH ile 24 saatlik inkübasyonunu takiben soya hücre ekstraktının 0,3 mg/ml dozu %19,6, 1 mg/ml dozu %33,8 oranında melanin içeriğini azaltmıştır. Soya hücre ekstraktı doza bağlı olarak *in vitro* melanin sentezini önemli derecede baskılamıştır. Soya hücre ekstraktının *in vitro* anti-tirozinaz aktivitesi de B16-F10 melanoma hücrelerinde incelenmiştir. α -MSH ile 24 saatlik inkübasyonu takiben 48 saat soya hücre ekstraktının 0,3 mg/ml dozu ile inkübe edilen hücrelerde %19,3 ve 1 mg/ml dozu ile inkübe edilenlerde ise %24,4 oranında anti-tirozinaz aktivite belirlenmiştir. Sonuçta soya hücre ekstraktı doza bağlı olarak etkili *in vitro* anti-tirozinaz aktivite göstermiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

Soya hücre ekstraktının *in vitro* melanin sentezi ve tirozinaz aktivite baskılama etkisinin moleküler mekanizmasını araştırmak amacıyla gen ve protein düzeyinde çalışmalar yapılmıştır. Soya hücre ekstraktının melanogenezin anahtar enzimi olan TYR, diğer görevli enzimler olan TYRP1 ve TYRP2'nin ve bu üç enzimi kodlayan genlerin de transkripsiyonundan sorumlu MITF transkripsiyon faktörünün gen ve protein düzeyinde ifadelerine etkisi incelenmiştir.

Çalışmamızda B16-F10 melanoma hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla α -MSH uygulanması, TYR, TYRP2 ve MITF geninin ifadesinin anlamlı şekilde arttırırken TYRP1 geninin ifadesinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. α -MSH uygulamasını takiben soya hücre ekstraktı konsantrasyonları (0,5 ve 1 mg/ml) ile 48 saat inkübe edilen hücrelerde ise TYR, TYRP1, TYRP2 ve MITF genlerinin ifadesinin doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Soya hücre ekstraktının melanogenezin anahtar enzimlerini kodlayan genlerin ifadesini doza bağlı azalttığı sonucu ekstraktın transkripsiyonel olarak melanogenezi baskıladığını göstermektedir. Dolayısıyla soya hücre ekstraktının doza bağlı *in vitro* melanin ve anti-tirozinaz aktivite göstermesinin, melanogenez sürecindeki anahtar enzimleri transkripsiyonel olarak baskılama yoluyla gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

Çalışmada B16-F10 hücrelerindeki gen ifade çalışmalarına paralel şekilde planlanarak melanogenezin temel enzimlerinin protein düzeyindeki ifadeleri de Western Blot yöntemi ile araştırılmıştır. Gen ifade analizi çalışmalarında olduğu gibi hücreler α -MSH uygulamasını takiben soya hücre kültürü ekstraktının konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edildikten sonra

protein ifade değişiklikleri incelenmiştir. Housekeeping protein olarak kullanılan beta-aktin'in ifadesinde tüm protein örnekleri arasında farklılık görülmemiştir. α -MSH uygulaması yapılmamış kontrol grubuna kıyasla α -MSH uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen proteinlerde bir miktar artış gözlenirken soya hücre kültürü ekstraktı konsantrasyonu uygulanan hücrelerden elde edilen proteinlerde TYR, TYRP1 ve TYRP2 proteinlerinin ifadesinde doza bağlı olarak belirgin şekilde azalma gözlenmiştir. MITF proteinin ifadesinde de soya hücre ekstraktının yüksek dozunun uygulandığı hücrelerde (1 mg/ml), α -MSH grubuna göre azalma belirlenmiştir. Anti-tirozinaz aktivite gösterdiği bilinen kojik asit, *in vitro* melanin içerik ve anti-tirozinaz aktivite testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Protein analizlerinde de kullanılan kojik asitin her iki dozu da proteinlerin ifadesinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır. Kojik asit, tirozinaz enzimini şelatlayarak aktivitesini baskılamaktadır (Masum ve diğ., 2019). Dolayısıyla, kojik asit, anti-tirozinaz aktivite ile melanin sentezini azaltmakta olup transkripsiyonel olarak etkisi bulunmamaktadır ve protein analizlerinde bulunan sonuçlar bunu doğrulamaktadır (Şekil 4.21).

Western Blot analizlerinde kromojenik olarak görüntülemeye uygun sekonder antikor ve substrat kullanılmıştır. Buna bağlı olarak da ifadesi daha az olan proteinlerin bant görüntülerinin netliği azalmıştır. Western Blot çalışmalarında kromojenik görüntülemeye proteinlere özğü bant oluşum hassasiyeti kemilüminesans görüntülemeye oranla daha düşük olmaktadır. Bunun yanında kullanılan primer antikorların da her üretiminde kalite ve hassasiyetinde farklılık olabilmektedir. Net bant görüntülerinin elde edilebilmesi için TYR, TYRP1, TYRP2 ve MITF proteinlerine ait 2 farklı üretime ait primer antikor temin edilip çalışmalar tekrar edilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan primerlerin kalitesine bağlı olarak da bantların netliğinde artış gözlenmiştir. Ancak yine de tirozinaz ve MITF proteinlerine ait bantların kromojenik görüntülemeye göre kemilüminesans görüntüleme sistemi ile daha belirgin elde edilebileceği düşünölmüştür. Çalışmamızda TYR ve MITF proteinlerine ait bantlar diğer proteinlere kıyasla daha az belirgin görünmelerine rağmen primerlerin bilgi dosyasında belirtilen moleküler ağırlıklarda (TYR; 90 kDa, MITF; 60 kDa) belirlenmiştir. Her iki proteinin ifadesinde soya hücre ekstraktı konsantrasyonlarına bağlı azalma ayırt edilebilecek şekilde gözlenebilmiştir.

Soya hücre ekstraktı uygulanan hücreler ile yapılan protein ifade analizlerinde de gen ifadesi analizlerine paralel sonuçlara ulaşılmıştır. Bu veriler dahilinde soya hücre ekstraktının B16-F10

melanoma hücrelerinde hem gen hem de protein düzeyinde melanogenezin temel enzimlerini doza bağlı olarak baskıladığı sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde soya hücre ekstraktının anti-tirozinaz ve melanin sentezi üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Soya ekstraktının ise içerdiği serin proteinaz inhibitörlerine bağlı pigmentasyon giderici aktivite gösterdiğini açıklayan bazı çalışmalar bulunmaktadır. Paine ve diğ., (2001), soyada bulunduğu bilinen STI (soya tripsin inhibitörü) ve BBI (Bowman-Birk proteaz inhibitörü)'nün keratinosit ve melanositlerden oluşan kültürlerde, PAR-2 (proteaz-aktif reseptör 2) aktivasyonunu baskılayarak malanozom transferini etkilediği, keratinosit fagositozunu azalttığı ve bunun sonucunda pigment üretimini azalttığı bildirilmiştir. Soyanın aynı etki mekanizması üzerine yapılan başka bir çalışmada serin proteinaz inhibitörce zengin bir soya hücre ekstraktı ile elde edilmiş formülasyonun gönüllü kişilerin lekelerindeki etkisi incelenmiştir. 3 hafta sonra lekelerde belirgin oranda azalma belirlenmiştir ve soya proteaz inhibitörünün PAR-2 aktivasyonunu baskılama yoluyla pigmentasyonu azalttığı öne sürülmüştür (Hermannsa ve diğ., 2000).

Soya ekstraktı ile yapılan bu çalışmalarda soyada bulunan serin proteinaz inhibitörlerinin anti-melanogenez aktiviteleri üzerine araştırmalar yürütülmüştür. Soya ekstraktının içinde bulunan izoflavonoid ve diğer fenoliklerin anti-melanogenez aktivitesine dair herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Ancak soyada bulunan serbest yağ asitleri ve CoA esterlerinin tripsini baskılama aktivitelerinden dolayı PAR-2 baskılanmasına katkıda bulunabileceği ve izoflavonoidler sayesinde de tirozinaz aktivite gösterebileceği ihtimalinden bahsedilmiştir (Hermannsa ve diğ., 2000).

Çalışmamızda soya hücre kültürlerinin farklı izoflavonoid ve diğer fenolik bileşikleri içeren etanolik ekstraktının anti-melanogenez aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan çalışmaların sonucunda soya hücre ekstraktının etkili bir şekilde melanin sentezini azalttığı ve anti-tirozinaz aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Literatürdeki veriler ve çalışmamız sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda soyanın;

1. İçerdiği serin proteinaz inhibitörleri ile PAR-2 aktivasyonunu baskılama yoluyla,

2. İçerdiği izoflavonoid ve diğer fenolik bileşiklerin sinerjik etkisi ile melanogenez ilişkili gen ve proteinlerin ifadesini baskılama yoluyla,

olmak üzere iki farklı mekanizma ile anti-melanogenez aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Soya hücre ekstraktı veya soya ekstraktının melanogeneze etkisi üzerine yapılmış başka bir çalışmanın olmamasından dolayı çalışmamızda bulunan sonuçlar ile kıyaslamak adına farklı bitkilerden elde edilen ekstraktların melanogenez üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar karşılaştırılmıştır.

Sargassum polycystum bitkisine ait etanol, su, hekzan, etil asetat çözücülerini ile elde edilmiş ekstraktların B16-F10 melanoma hücrelerinin melanin sentezine ve tirozinaz aktivitesine etkileri incelenmiştir. *Sargassum polycystum* etanolik ekstraktının 0,5 mg/ml konsantrasyonu 72 saat inkübe edilen B16-F10 melanoma hücrelerinde %30 oranında hücre canlılığı azalması ile birlikte *in vitro* tirozinaz aktivitenin %39 oranında azaldığı bildirilmiştir. Dolayısıyla, ekstraktın yüksek tirozinaz baskılama aktivitesinin hücre canlılığını azaltması ile ilgisi bulunmaktadır. Bitkiye ait hücre canlılığını azaltmayan tek ekstraktın ise su ekstraktının olduğu, su ekstraktının ise 0,5 mg/ml dozunun 72 saat inkübasyon sonrasında %18 oranında hücresel tirozinaz aktiviteyi baskıladığı raporlanmıştır (Chan ve diğ., 2011).

Phyla nodiflora bitkisine ait metanolik ekstraktın 12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonları ile B16-F10 melanoma hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda melanin içeriğinin doza bağlı azaldığı ve ekstraktın en yüksek dozunun kontrole kıyasla melanin sentezini %40'dan tirozinaz aktiviteyi ise %20'den fazla oranda baskıladığı bildirilmiştir. TYR, TRP1, TRP2 ve MITF proteinlerinin ifadesini de doza bağlı olarak azalttığı belirtilmiştir (Yen ve diğ., 2012). Ancak çalışmada α -MSH uygulaması yapılmamıştır. Dolayısıyla α -MSH uyarımı sonrasındaki melanin sentezini ve tirozinaz aktiviteyi baskılayıcı aktivitesi değerlendirilmemiştir.

Bir çalışmada *Gastrodia elata* Blume (GEB) bitkisinin su ekstraktının 0-5 mg/ml konsantrasyonları ile 72 saat inkübe edilen B16-F10 melanoma hücrelerinde melanin içeriği ve tirozinaz aktivite araştırılmıştır. 200 nM α -MSH ile 24 saat uyarımını takiben ekstraktın 0,5 mg/ml dozunun %11, 1 mg/ml dozunun ise %22 oranında melanin içeriğini azalttığı ekstrakt

dozlarının sırasıyla %20 ve 25 oranında anti-tirozinaz aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmada GEB ekstraktının, TYR, TRP1, TRP2 ve MITF gen ve proteinlerini de doza bağlı baskıladığı bildirilmiştir (Shim ve diğ., 2017).

Kim ve diğ., (2016) çalışmalarında *Rhododendron weyrichii* çiçeklerinin su ve farklı oranlardaki etanol (%20, %50, %70 ve %100) ekstraktlarının anti-melanogenez aktivitelerini araştırmıştır. Çalışmada B16-F10 melanoma hücreleri 200 nm α -MSH ve ekstraktlarla 72 saat inkübe edildikten sonra hücrelerdeki melanin içerik ve tirozinaz aktivite değerlendirilmiştir. Sonuçta kontrol grubuna kıyasla *Rhododendron weyrichii* %70 etanol ve su ekstraktının 0,2 mg/ml konsantrasyonlarının sırasıyla %52,5 ve %51,6 oranında melanin sentezini ve doza bağlı hücresel tirozinazı baskıladığı bildirilmiştir. Su ekstraktının TYR ve TRP1 proteinlerinin ifadesini baskımlarken TRP2 proteininin ifadesini değıştirmediği, etanol ekstraktının ise TYR ve TRP2 protein ifadesini azaltırken TRP1 proteininin ifadesinde değışikliğe neden olmadiği bulunmuştur (Kim ve diğ., 2016).

Muz kabuğunun farklı çözücülerle yapılan ekstraktlarının anti-melanogenez aktivitesini araştırmak için yapılan bir çalışmada metanolik muz kabuğı ekstraktı, çalışılan ekstraktlar içerisinde en etkili melanogenez baskılayıcısı olarak bulunmuştur. Çalışmada, B16-F10 melanoma hücreleri metanolik ekstraktın 0,1 mg/ml konsantrasyonu ve α -MSH ile 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında kontrol grubuna kıyasla ekstraktın %66 oranında tirozinaz baskılama aktivitesi gösterdiğiği bildirilmiştir. Ekstraktın doza bağılı olarak TYR ve MITF proteinlerinin ifadesini de azalttığı raporlanmıştır (Phacharapiyangkul ve diğ., 2019).

Melochia corchorifolia metanol ekstrakt dozları (10, 20 ve 50 μ g/ml) ile 3 gün inkübe edilen B16-F10 melanoma hücrelerinde *in vitro* melanin içeriğinin ve tirozinaz aktivitenin önemli derecede azaldığı, TYR ve MITF'nin mRNA ve protein düzeyinde ifadesinin baskılandığı bildirilmiştir (Yuan ve diğ., 2020).

Hiperpigmentasyon karşı ajan olma potansiyelini ortaya koymak amacıyla farklı bitkilere ait ekstraktlar ile yapılan bu çalışmaların bazılarında soya hücre ekstraktına göre daha düşük oranda melanin sentezi baskılama ve anti-tirozinaz aktivite belirlenirken bazılarında ise daha düşük dozlarda benzer ya da daha yüksek aktivite bulunmuştur. Farklı bitkilerden elde edilen

ekstraktların anti-melanogenez aktivitelerinin değerlendirildiği bu çalışmaların deney basamaklarında;

- B16-F10 melanoma hücrelerinde α -MSH uygulamasının yapılıp yapılmaması,
- Uygulanan α -MSH konsantrasyonunun farklı olması (100 nm ve 200 nm),
- Ekstrakt ve α -MSH uygulamasının aynı anda yapılması ya da α -MSH uygulamasını takiben ekstraktın uygulanması,
- Ekstrakt ile hücrelerin inkübasyonunun 24, 48 ve 72 saat gibi farklı sürelerde olması gibi farklılıklar bulunmaktadır.

Deney basamaklarındaki bu farklılıklardan dolayı çalışmalarda raporlanan sonuçlar, bitki ekstraktlarının melanin sentezi ve tirozinaz baskılama aktivitelerinin arasındaki farklılığı net olarak yansıtmamaktadır. Ancak bu farklılıklara rağmen literatürdeki diğer bitki ekstraktları ile birlikte değerlendirildiğinde de soya hücre ekstraktının etkili anti-melanogenez aktivite gösterdiği görülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada soya hücre ekstraktı sitotoksikite göstermeden önemli derecede *in vitro* melanin sentezini ve tirozinaz aktiviteyi baskılamıştır. İzoflavonoid ve diğer fenolik bileşikler içeren soya hücre ekstraktının anti-melanogenez aktivitesinin altında yatan mekanizmayı aydınlatmak amacıyla gen ve protein analizleri yürütülmüştür. Soya hücre ekstraktının, melanogenezin temel enzimleri olan TYR, TYRP1, TYRP2 ve bunların düzenlenmesini sağlayan MITF transkripsiyon faktörünün ifadelerini gen ve protein düzeyinde baskılayarak anti-melanogenez aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Bu veriler doğrultusunda soya hücre ekstraktı, cilt beyazlatıcı kozmetik ürünlerde kullanılmak üzere güvenilir ve etkili bir ajan olarak değerlendirilebilir. Soya hücre ekstraktının *in vitro* olarak belirlenen anti-melanogenez aktivitesini *in vivo* olarak doğrulamak için gönüllü kişiler üzerinde etkinlik testlerinin yürütülmesi gerekli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abe, K. ve Matsuki, N., 2000, Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT, *Neuroscience Research*, 38, 325–329.
- Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M., 2007, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, *Nature Protocols*, 2(4), 875-877.
- Aktaş, T., Çölgeçen, H., 2017. Farklı Bitki Türlerinden Bitki Doku Kültürü Teknikleriyle Flavonoidlerin Üretimi, *Karaelmas Fen ve Müh. Derg.* 7(2), 665-673.
- Alam, M., B., Bajpai, V. K., Lee, J., Zhao, P., Byeon, J. H., Ra, J. S., Majumder, R., Lee, J. S., Yoon, J. I., Rather, I. A., Park, Y. H., Kim, Kçi Na, M., Lee, S. H., 2017, Inhibiton of melanogenesis by jineol from *Scolopendra subspinipes mutilans* via MAP-Kinase mediated MIF downregulation and the proteasomal degradation and the proteasomal degradation of tyrosinase, *Scientific Reports*, 7 (45858),1-7.
- Barbulova, A., Apone, F., Colucci, G., 2014, Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients, *Cosmetics*, 1, 94–104.
- Barbulova, A., Tito, A., Carola, A., Bimonte, M., de Laurentis, F., D’Ambrosio, P., Apone, F., Colucci, G., 2010, Raspberry stem cell extract to protect skin from inflammation and oxidative stress, *Cosmet. Toilet.*,125, 38–47.
- Biberoğlu, G., 2003, Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı, *T Klin J Med Sci*, 23, 491-498.
- Boubaker, J., Bzeouich, I.M., Nasr, N., Ghazlen, H.B., Mustapha, N., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2015. Phytochemical capacity of *Nitraria retusa* leaves extracts inhibiting growth of melanoma cells and enhancing melanogenesis of B16F10 melanoma, *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 300.
- Burger, P., Landreau, A., Azoulay, S., Michel, T., Fernandez, X., 2016, Skin Whitening Cosmetics: Feedback and Challenges in the Development of Natural Skin Lighteners, *Cosmetics*, 3 (36), 1-24.
- Chan, Y.Y., Kim, K.H., Cheah, S.H., 2011, Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 1183–1188.
- Chang, T-S., Ding, H-Y., Lin, H-C., 2005, Identifying 6,7,4’-Trihydroxyisoflavone as a Potent Tyrosinase Inhibitor, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 69 (10), 1999–2001.

- Cho, Y. C., Han, J. B., Park, S. I., 2019, Photoprotective Effects of Soybean Extract against UV-Induced Damage in Human Fibroblast and Hairless Mouse Model, *J Anim Reprod Biotechnol*, 34, 20-29.
- Choi, M. H., Shin, H. J., 2016, Anti-Melanogenesis Effect of Quercetin, *Cosmetics*, 3,18, 1-16.
- Chung, Y. C., Ko, J. H., Kang, H. K., Kim, S., Kang, C. I., Lee, J. N., Park, S. M., Hyun, C. G., 2018, Antimelanogenic Effects of *Polygonum tinctorium* Flower Extract from Traditional Jeju Fermentation via Upregulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Protein Kinase B Activation, *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (2895), 1-15.
- Couteau, C., Coiffard, L., 2016, Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products, *Cosmetics*, 3(27),1-16.
- Devi, M. K. A., Giridhar, P., 2014, Isoflavone Augmentation in Soybean Cell Cultures Is Optimized Using Response Surface Methodology, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 3143–3149.
- Devi, M. K. A., Kumar, S. S., Giridhar, P., 2018, LC–ESI–MS based characterisation of isoflavones in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) from India, *J Food Sci Technol*, 55(12), 5045-5054.
- Dzialo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., and Kulma, A., 2016, The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders, *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 160-201.
- Efferth, T., 2019, Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures, *Engineering* 5, 50–59.
- Eibl, R., Meier, P., Stutz, I., Schildberger, D., Hühn, T., Eibl, D., 2018, Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 8661–8675.
- Eser, B., Dinçel, S. A., Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları, *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51-57.
- Federicia, E., Touche, A., Choquartb, S., Avantia, O., Faya, L., Offorda, E., Courtois, D., 2003, High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures, *Phytochemistry*, 64, 717–724.
- Fotakis, G., 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, 171–177.
- Freitas, C. S., Silva, H. A., Perrone, D., Vericimo, M. A., Diego, Baião, B. S., Pereira, P.R., Paschoalin, V. M. F., Aguila, E. M. D., 2019, Recovery of Antimicrobials and Bioaccessible Isoflavones and Phenolics from Soybean (*Glycine max*) Meal by Aqueous Extraction, *Molecules*, 24 (1), 74.
- Güven, A., Gürsul, I., 2014, Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Sentezi, *GIDA*, 39 (5), 299-306.

- Hermannsa, J. F., Petita, L., Martalao, O., Piérard-Franchimonta, C., Cauwenberghb, G., Piérard, G. E., 2000, Unraveling the Patterns of Subclinical Pheomelanin-Enriched Facial Hyperpigmentation: Effect of Depigmenting Agents, *Dermatology*, 201, 118–122.
- Hua, C., Wonga, W. T., Wua, R., Lai, W. F., 2019, Biochemistry and use of soybean isoflavones in functional food development, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 5, 1-15.
- Jang, J.Y., Kim, H.N., Kim, Y.R., Choi, Y.H., Kim, B.W., Shin, H.K., Choi, B.T, 2012, Aqueous fraction from *Cuscuta japonica* seed suppresses melanin synthesis through inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in B16F10 cells, *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 338-344.
- Jennifer, C., Stephanie, C.M., Abhishri, S. B., Shalini, B. U., 2012, A Review On Skin Whitening Property Of Plant Extracts, *Int J Pharm Bio Sci*, 3(4), 332 – 347.
- Jin, K.S., Lee, J.Y., Hyun, S.K., Kim, B.W., Kwon, H.J. 2015. *Juniperus chinensis* and the functional compounds, cedrol and widdrol, ameliorate α -melanocyte stimulating hormone-induced melanin formation in B16F10 cells, *Food Science and Biotechnology*, 24(2), 611-618.
- Jin, K.S., Oh, Y.N., Hyun, S.K., Kwon, H.J., Kim, B.W. 2014. Betulinic acid isolated from *Vitis amurensis* root inhibits 3-isobutyl-1-methylxanthine induced melanogenesis via the regulation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in B16F10 cells, *Food and Chemical Toxicology*, 68, 38-43.
- Jones, K., Kim, D. W., Park, J. S., Khang, C. H., 2016, Live-cell fluorescence imaging to investigate the dynamics of plant cell death during infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, *BMC Plant Biology*, 16 (69), 1-8.
- Karunarathne, W. A. H. M., Molagoda, H. M. N., Park, S. R., Kim, J. W., Lee, O. K., Kwon, H. Y., Oren, M., Choi, Y. H., Ryu, H. W., Oh, S. R., Jo, W. S., Lee, K. T., Kim, G. Y., 2019, Anthocyanins from *Hibiscus syriacus* L. Inhibit Melanogenesis by Activating the ERK Signaling Pathway, *Biomolecules*, 9 (645), 1-20.
- Kazmierski, L., Roszkowski, S., 2019, Plant stem cells culture a new tool for skin protection and regeneration, *Med Res J*, 4 (1), 52–57.
- Kierszenbaum, A. L., Tres, L. L., 2016, *Integumentary System*, Histology And Cell Biology, An Introduction to Pathology, 11, Elsevier Saunders, Canada, ISBN: 978-0-323-31330-8.
- Kim, A., Ma, J. Y., 2013, Anti-melanogenic activity of the novel herbal medicine, MA128, through inhibition of tyrosinase activity mediated by the p38 mitogen-activated protein kinases and protein kinase signaling pathway in B16F10 cells, *Pharmacognosy Magazine*, 10 (39), S462-S471.
- Kim, M. J., Jung, T. K., Park, H. C., Yoon, K. S., 2016, Effect of *Hoechunyangkyeok*-San Extract on Melanogenesis, *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 6, 85-95.

- Kim, M. J., Kim, S. S., Yun, S. H., Kim, S. Y., Hyun, K. H., Lee, J., Lee, N. H., Hyun, C. G., 2017, Melanogenesis Inhibitory Activity of *Rhododendron weyrichii* in Mouse B16 Melanoma Cells, *Orient. J. Chem.*, 32(4), 1899-1907.
- Kim, S. S., Kim, M. J., Choi, Y. H., Kim, B. K., Kim, K. S., Park, K. J., Park, S. M., 2013, Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma, *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(8), 617-622.
- Kolewe, M. E., Gaurav, V., Roberts, S. C., 2008, Pharmaceutically Active Natural Product Synthesis and Supply via Plant Cell Culture Technology, *Molecular Pharmaceutics*, 5(2), 243–256 .
- Lee, E. J., Cha, H. L. 2019, Inonotus obliquus Extract as An Inhibitor of α -MSH-Induced Melanogenesis in B16-F10 Mouse Melanoma Cells, *Cosmetics*, 6, 9.
- Lee, H., J., W. J., Chang, S. H., Lee, G. Y., 2015, Hesperidin, A Popular Antioxidant Inhibits Melanogenesis via Erk1/2 Mediated MITF Degradation, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 18384-18395.
- Lee, S. E., Park, S. H., Oh, S. W., Yoo, J. A., Kwon, K., Park, S. J., Kim, J., Lee, H. S., Cho, J. Y., Lee, J., 2018, Beauvericin inhibits melanogenesis by regulating cAMP/PKA/CREB and LXR- α /p38 MAPK-mediated pathways, *Scientific Reports*, 8(14958), DOI:10.1038/s41598-018-33352-8.
- Lee, Y.S., Kim, H.K., Lee, K.J., Jeon, H.W., Cui, S., Lee, Y.M., Moon, B.J., Kim, Y.H., Lee, Y.S., 2010, Inhibitory effect of glyceollin isolated from soybean against melanogenesis in B16 melanoma cells, *BMB reports*, 43(7), 461-467.
- Levin, L., Albert, D. M, 2010, Albinism, *Ocular Disease*, In: Cox, G. F., Fulton, A. B. (ed), 60, Saunders Elsevier, China, ISBN: 978-0-7020-2983-7, 467.
- Leyden, J. J., Shergill, B., Micali, G., Downie, J., Wall, W., 2011, Natural options for the management of hyperpigmentation, *JEADV*, 25, 1140–1145.
- Lin, J., W., Chiang, H. M., Lin, Y. C., Wen, K. C., 2008, Natural Products with skin-Whitening Effects, *Journal of Food and Drug Analysis*, 12 (2), 1-10.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25(4), 402-408.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., 2012, Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 378-398.
- Lupu, M., Caruntu, A., Caruntu, C., Papagheorghe, LML, Ilie MA, Voiculescu V, Boda D, Constantin C, Tanase C, Sifaki M, et al: Neuroendocrine factors: The missing link in non melanoma skincancer (Review). *Oncol Rep* 38: 1327-1340, 20172-390, 2015.

- Maranduca, M. A., Branisteanu, D., Serban, D. N., Branisteanu, D. C., Stoleriu, G., Manolache, N., Serban, I. L., 2019, Synthesis and physiological implications of melanic pigments, *Oncology Letters*, 17, 4183-4187.
- Maruyama, H., Kawakami, F., Lwin, T. T., Imai, M., Shamsa, F., 2018, Biochemical characterization of ferulic acid and caffeic acid which effectively inhibit melanin synthesis via different mechanisms in B16 melanoma cells, *Biol. Pharm. Bull.* 41, 806–810.
- Masum, M. N., Yamauchi, K., Mitsunaga, T., 2019, Tyrosinase inhibitors from Natural and synthetic sources, *Reviews in Agricultural Science*, 7, 41-58.
- Mello, A. N. D., Finlay, G. J., Baguley, B. C., Askarian-Amiri, M. E., 2016, Signaling Pathways in Melanogenesis, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (1144),1-18.
- Miastkowska, M., Sikora, E., 2018, Anti-Aging Properties of Plant Stem Cell Extracts, *Cosmetics*, 5 (55), 1-8.
- Mohiuddin, A. K., 2019, Skin Lightening & Management of Hyperpigmentation, *Pharmaceutical Sciences & Analytical Research Journal*, 2(2), 180020.
- Morus, M., Baran, M., Rost-Roszkowska, M., Skotnicka-Graca, U., 2014, Plant Stem Cells as Innovation in Cosmetics, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 71 (5), 701-707.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65, 55–63.
- Mustafa, N.R., Winter, W. D., Iren, F.V., Verpoorte. R., 2011, Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures, *Nature protocols*, 6(6), 715-42.
- Nomura, T., Ogita, S., Kato, Y., 2018, Rational metabolic-flow switching for the production of exogenous secondary metabolites in bamboo suspension cells, *Scientific Reports*, 8, 13203.
- Okazaki, S., Funasaka, Y., Wakamatsu, K., Kawana, S., Saeki, H., 2015, Effect of infrared radiation A on photoaged hairless mice harboring eumelanin and pheomelanin in the epidermis, *Journal of Dermatology*, 42,1–9.
- Paine, C., Sharlow, E., Liebel, F., 2001, An alternative approach to depigmentation by soybean extracts via inhibition of the PAR-2 pathway, *J Invest Dermatol*, 116, 587–595.
- Panizzi, M. C. C., Favoni, S. P. G., Kikuchi, A., 2002, Extraction time for Soybean Isoflavone Determination, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 515-518.
- Panzella, L., Napolitano, A., 2019, Natural and Bioinspired Phenolic Compounds as Tyrosinase Inhibitors for the Treatment of Skin Hyperpigmentation: Recent Advances, settings, *Cosmetics*, 6(4), 57-90.

- Papaioanou, M., Chronopoulou, E., Ciobotari, G., Efrose, R., 2018, Cosmeceutical properties of two cultivars of red raspberry grown under different conditions, *Cosmetics*, 5, 20.
- Park, J.S., Kim, D.H., Lee, J.K., Lee, J.Y., Kim, D.H., Kim, H.K., Lee, H.J., Kim, H.C., 2010, Natural ortho-dihydroxyisoflavone derivatives from aged Korean fermented soybean paste as potent tyrosinase and melanin formation inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 1162–1164.
- Peiretti, P. G., Karama, M., Janiak, M., Longato, E., Meineri, G., Amarowicz, R., Gai, F., 2019, Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Plant during Growth Cycle, *Agronomy*, 9, 153, 1-15.
- Phacharapiyangkul, N., Krit Thirapanmethee, K., Sangiamsuntorn, K., Panich, U., Lee, C. H., Chomnawang, M. T., 2019, Effect of Sucrier Banana Peel Extracts on Inhibition of Melanogenesis through the ERK Signaling Pathway, *Int. J. Med. Sci.*, 16(4), 602-606.
- Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M., Jung, S. H., 2018, Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review, *J. Med. Cem*, 61, 7395-7418.
- Prabakaran, M., Lee, J. H., Ahmad, A., Kim, S. H., Woo, K. S., Kim, M. J., Chung, M., 2018, Effect of Storage Time and Temperature on Phenolic Compounds of Soybean (*Glycine max* L.) Flour, *Molecules*, 23, 2269-2289.
- Ribeiro, A. S., Estanqueiro, M., Oliveira, M. B., Lobo, J. M. S., 2015, Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products, *Cosmetics*, 2, 48-65.
- Roopan, S. M., Madhumitha, G., 2018, *Phytochemical and Pharmacological Importance of Plant Secondary Metabolites in Modern Medicine*, Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview, In: Velu, G., Palanichamy, V., Rajan, A.P. (ed), 8, Springer International Publishing AG, Switzerland, ISBN 978-3-319-74209-0.
- Sansanelli, S., Zanichelli, D., Filippini, A., Ferri, M., Tassoni, A., 2014, Production of free and glycosylated isoflavones in vitro soybean (*Glycine max* L.) hypocotyl cell suspensions and comparison with industrial seed extracts, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 119, 301–311.
- Sarkar, R., Arora, P., Garg, K. V., 2013, Cosmeceuticals for Hyperpigmentation: What is Available?, *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 6(1), 1-11.
- Schmid, D., Schurch, C., Blum, P., Belser, E., Zulli, F., 2008, Plant stem cell extract for longevity of skin and hair, *SOFW J.*, 5, 30–35.
- Schmid, D., Zulli, F., 2012, Use of plant cell cultures for a sustainable production of innovative ingredients. *SOFW J.*, 138, 2–10.
- Schürch, C., Blum, P., Zulli, F., 2008, Potential of plant cells in culture for cosmetic application, *Phytochem Rev*, 7, 599–605.
- Seiberg, M., 2001, Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer, *Pigment. Cell Res.*, 14, 236–242.

- Seiberg, M., Paine, C., Sharlow, E., 2000, Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening, *J Invest Dermatol*, 115, 162–167.
- Seo, G. Y., Ha, Y., Park, A. H., Kwon, O. W., Kim, Y. J., 2019, Leathesia difformis Extract Inhibits α -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Cells via Down-Regulation of CREB Signaling Pathway, *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (536), 1-16.
- Serre, C., Busuttill, V, Botto, J. M., 2018, Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation, *International Journal of Cosmetic Science*, 40, 328–347.
- Shim, E., Song, E., Choi, K. S., Choi, H. I., Hwang, J., 2017, Inhibitory effect of Gastrodia elata Blume extract on alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in murine B16F10 melanoma, *Nutrition Research and Practice*, 11(3), 173-179.
- Slavin, M., Cheng, Z., Luther, M., Kenworthy, W., Yu, L. L., 2009, Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Maryland-grown soybean lines with altered fatty acid profiles, *Food Chemistry*, 114, 20–27.
- Slominski A. T., Zmijewski M. A., Skobowiat, C., Zbytek, B., Slominski, R. M., Steketee, J. D., 2012, Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system, *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 212,1-115.
- Smith, F., L., Meyskens, F.L., 2016, Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma, *Mol. Nutr. Food Res.*, 60, 1264–1274.
- Ssanghwa- tang, an oriental herbal cocktail, exerts anti-melanogenic activity by suppression of the p38 MAPK and PKA signaling pathways in B16F10 cells, *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 214.
- Su, R., Sujarani, M., Shalini, P., Prabhu, N., 2019, A Review on Bioreactor Technology Assisted Plant Suspension Culture, *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 5(3), 1-13.
- Tito, A., Carola, A., Bimonte, M., Barbulova, A., Arciello, S., de Laurentiis, F., Monoli, I., Hill, J., Gibertoni, S., Colucci, G., 2011, A tomato stem cell extract, containing antioxidant compounds and metal chelating factors, protects skin cells from heavy metal induced damages, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 33, 543–552.
- Topçu, Ş., Çölgeçen, H., 2015, Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derl. Der.*, 8 (2), 09-29.
- Toso, R. D., Melandri, F., 2009, Biotechnologically produced botanical ingredients, *Nutra foods*, 8(2), 29-33.
- Trehan, S., Kohn, B. M., Beri, K., 2017, Plant stem cells in cosmetics: current trends and future directions, *Future Sci. OA*, 3(4), eISSN 2056-5623.

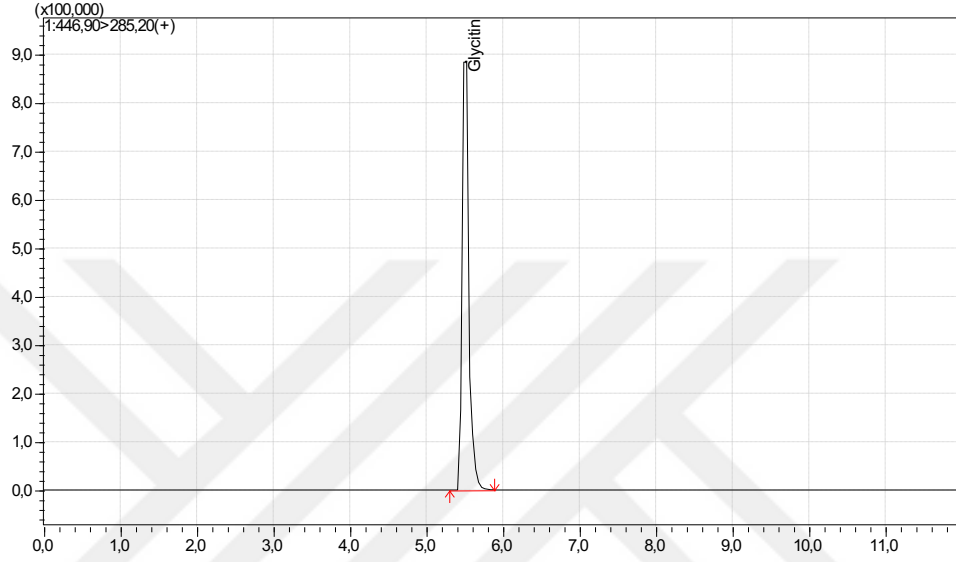
- Tripathi, M. K., Mishra, N., Tiwari, S., Shyam, C., Singh, S., Ahuja, A., 2019, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 8 (2), 1002-1010.
- Tuerxuntayi, A., Liu, Y., Tulake, A., Kabas, M., Eblimit, A., Aisa, H. A., 2014, Kaliziri extract upregulates tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in murine B16 melanoma cells, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14 (166), 1-9.
- Uyen, L. D. P. U., Nguyen, D. H., Kim, E. K., 2008, Mechanism of Skin Pigmentation, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13, 383-395.
- Vachtenheim, J., Borovansky, J., 2010, Transcription physiology of pigment formation in melanocytes: central role of MITF, *Experimental Dermatology*, 19, 617–627.
- Vargas, L. V. M., Flota, V. F., 2006, *Callus and Suspension Culture Induction, Maintenance, and Characterization*, Plant Cell Culture Protocols, In: Paz, A. R., Sánchez, M. N., V., Rosa María Álvarez, R. M. A., Garfias, A. E. J., 5, Humana Press, United States of America, ISBN 1-58829-547-8, 55.
- Videira, I. F., Moura, D. F., Magina, S., 2013, Mechanisms regulating melanogenesis, *An Bras Dermatol*, 88, 76-83.
- Vijayakumar, R., 2018, Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools, Secondary Metabolites: Sources and Applications, In: S., Romano, A.(ed), 5, IntechOpen, Croatia, ISBN: 978-1-78923-643-9.
- Vilela, F. M. P., Syed, D. N., Chamcheu, J. C., Calvo-Castro, L. A., Fortes, V. S., Fonseca, M. J. C., Mukhta, H., 2014, Biotransformed Soybean Extract (BSE) Inhibits Melanoma Cell Growth and Viability In Vitro: Involvement of Nuclear Factor-Kappa B Signaling, *PLOS ONE*, 9, 7, e103248.
- Villarreal, M. O., Howat, S., Hong, S., Jang, M. O., Jin, Y. W., Lee, E. K., Loak, G. J., 2016, Plant cell culture strategies for the production of natural products, *BMB Rep.*, 49(3), 149-158.
- Wang, B.S., Juang, L. J., Yang, J. J., Chen, L. Y., Tai, H. M., Huang, M. H., 2012, Antioxidant and Antityrosinase Activity of *Flemingia macrophylla* and *Glycine tomentella* Roots, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012 (3), 431081.
- Waqas, M. K., Akhtar, N., Mustafa, R., Jamshaid, M., Khan, H. M. S., Murtaza, G., 2015, Dermatological And Cosmeceutical Benefits Of Glycine Max (Soybean) And Its Active Components, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 72(1), 3-11.
- Yao, C., Jin, C. L., Oh, I. G., Park, C. H., Chung, J. H., 2015, Melia azedarach extract stimulates melanogenesis through increase of tyrosinase-related protein 1 expression in B16F10 mouse melanoma cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 35, 1761-1766.
- Yapar, E. A., 2017, Cilt Beyazlatıcılara Genel Bakış, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21, 48-53.

- Yen, F. L., Wang, M. C., Liang, C. J., Ko, H. H., Lee, C. W., 2012, Melanogenesis Inhibitor(s) from *Phyllanthus nodiflorus* Extract, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(1), 867494.
- Yuan, X. H., Tian, Y. D., Oh, J. H., Bach, T. T., Chung, J. H., Jin, H. C., Jin, Z. H., 2020, *Melochia corchorifolia* extract inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells via activation of the ERK signaling, *J Cosmet Dermatol*, 00, 1–7.
- Zhou, J., Shang, J., Ping, F., Zhao, G., 2012, *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 639-647.
- Zwenger, S., Basu, C. (2008), Plant terpenoids: applications and future potentials, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3 (1), 001- 007.

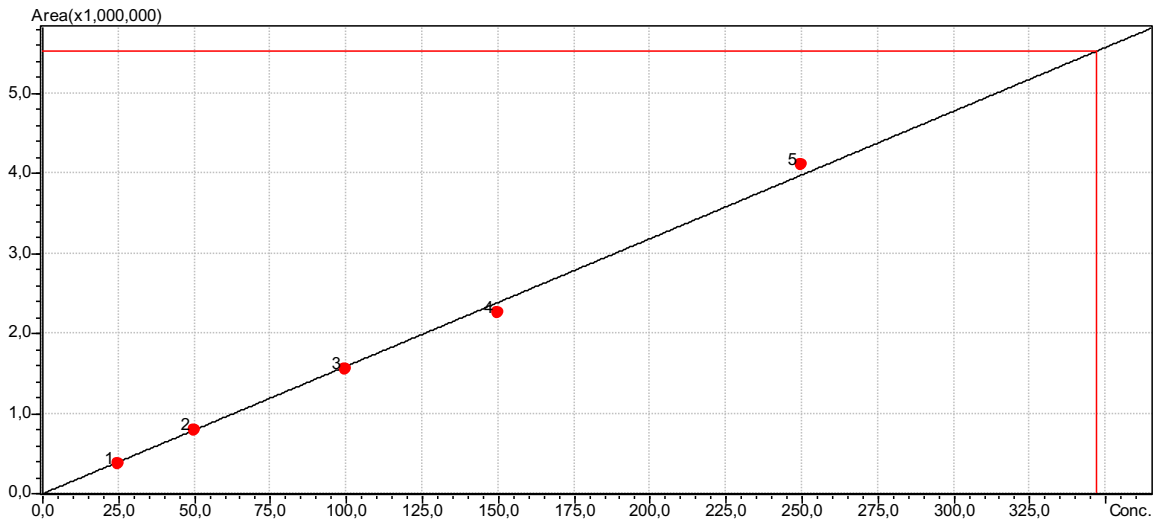


EKLER

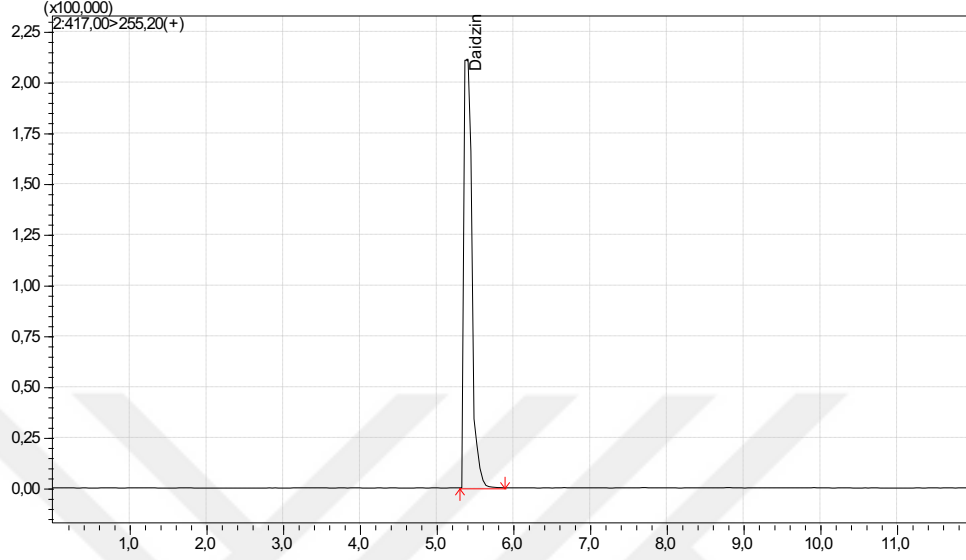
EK 1. Glisitin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



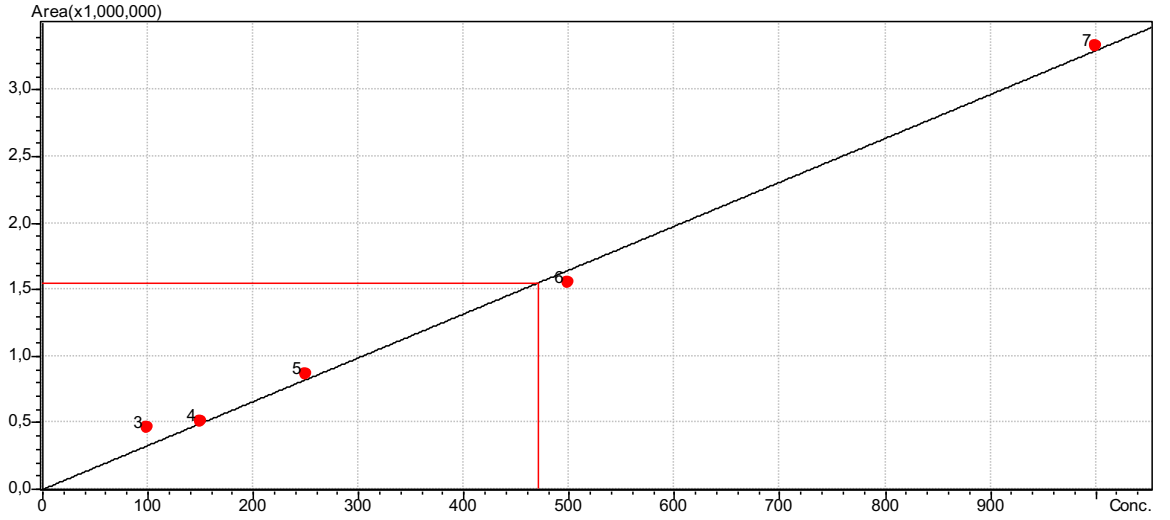
EK 2. Glisitin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



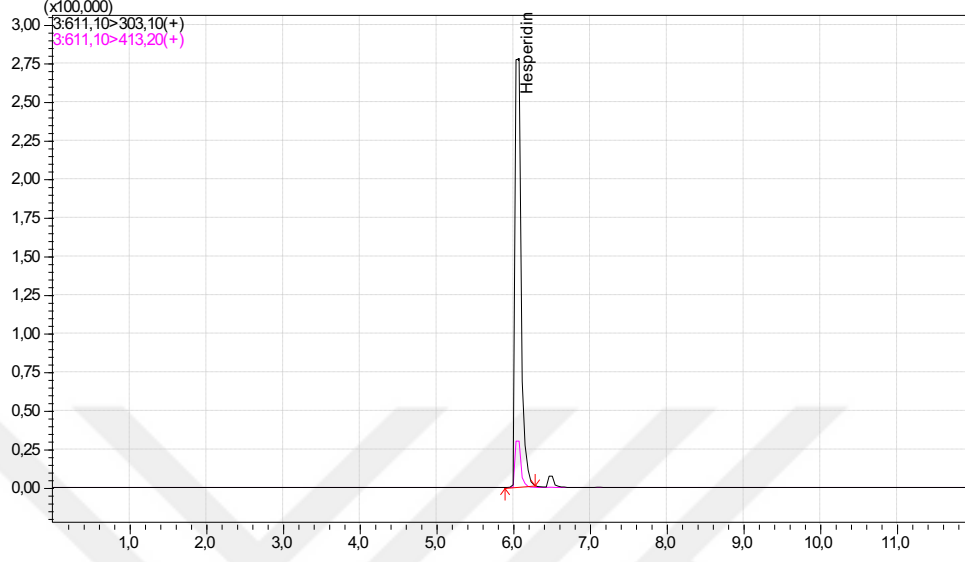
EK 3. Daidzin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



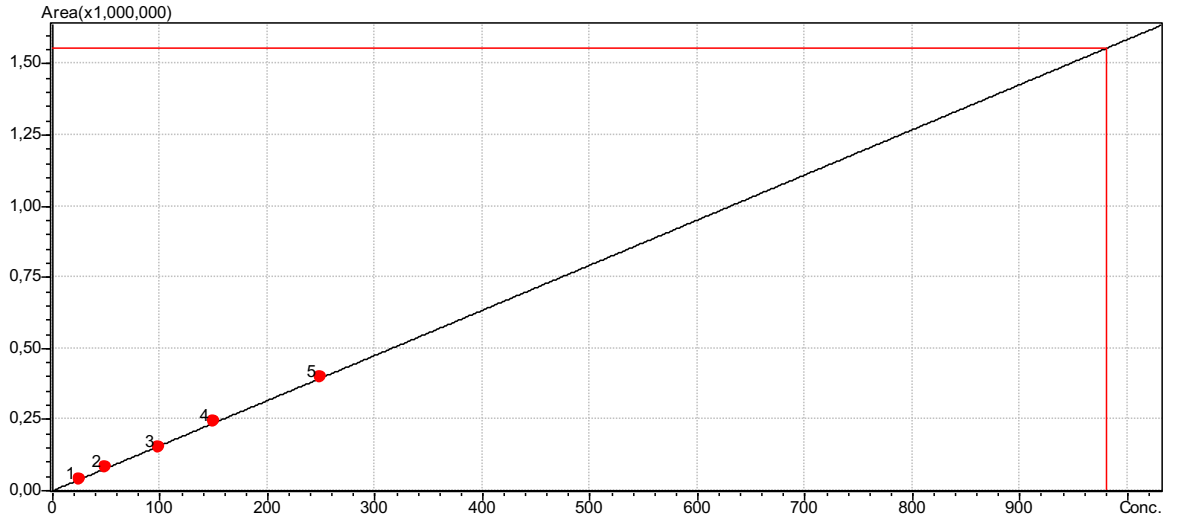
EK 4. Daidzin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



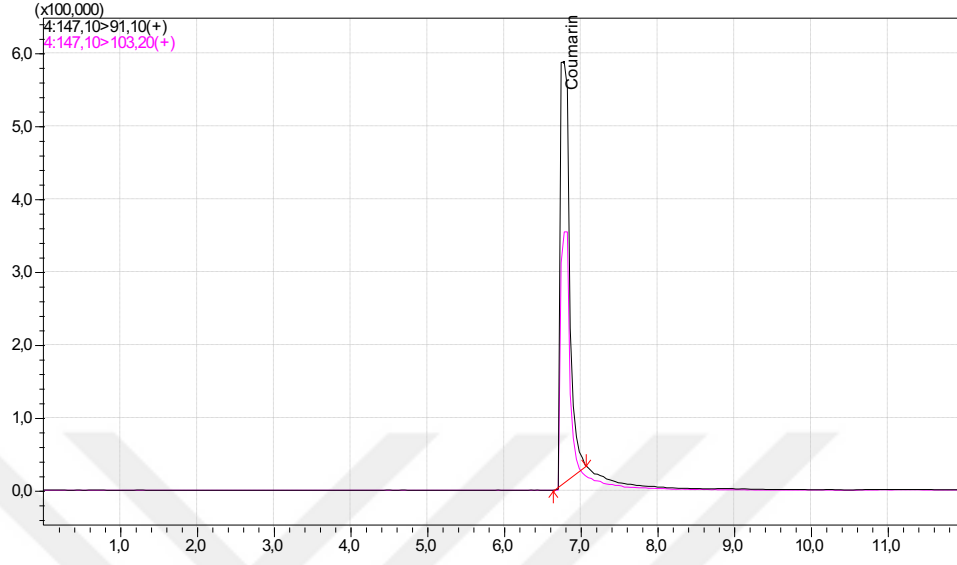
EK 5. Hesperidin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



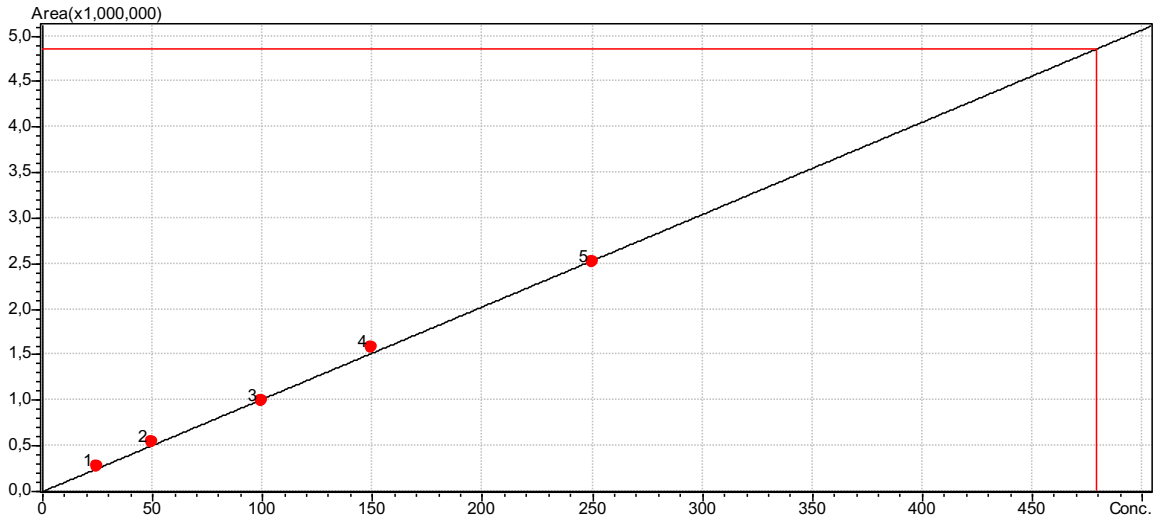
EK 6. Hesperidin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



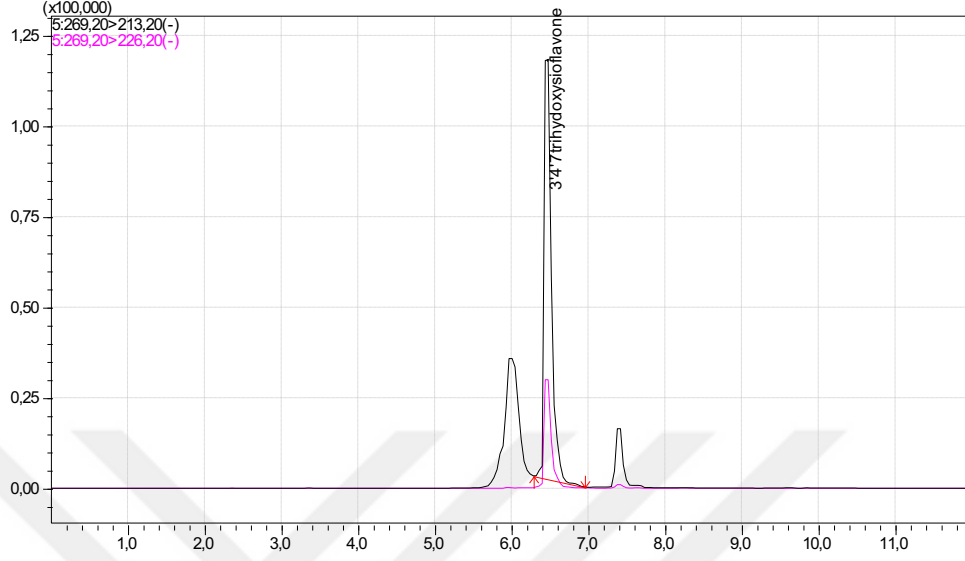
EK 7. Kumarin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



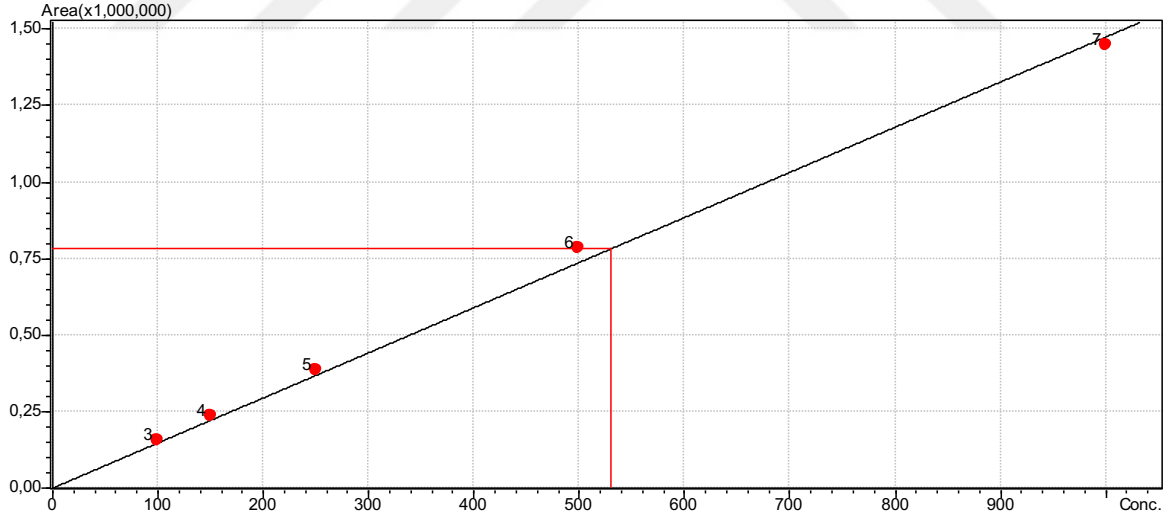
EK 8. Kumarin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



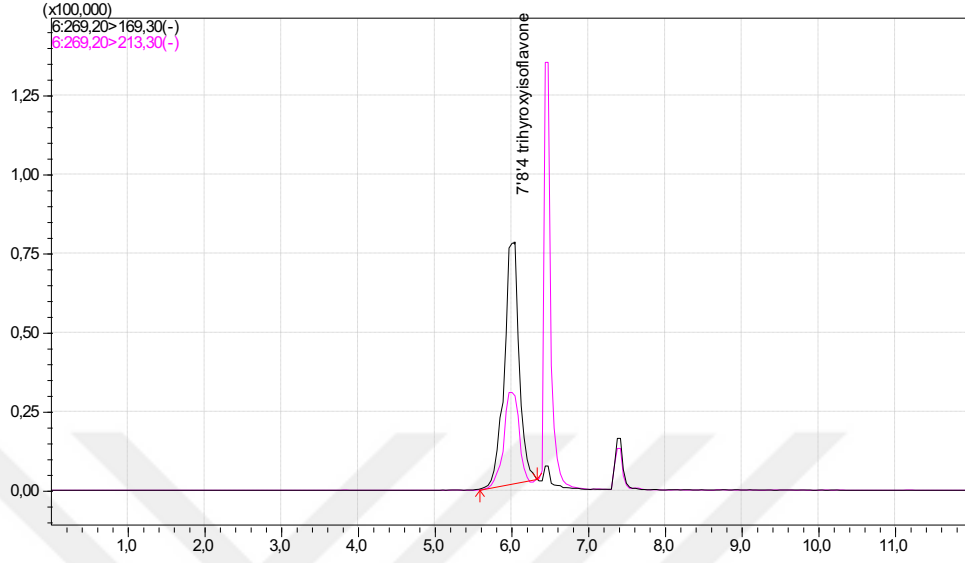
EK 9. 7,3',4'-trihidroksiizoflavon standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



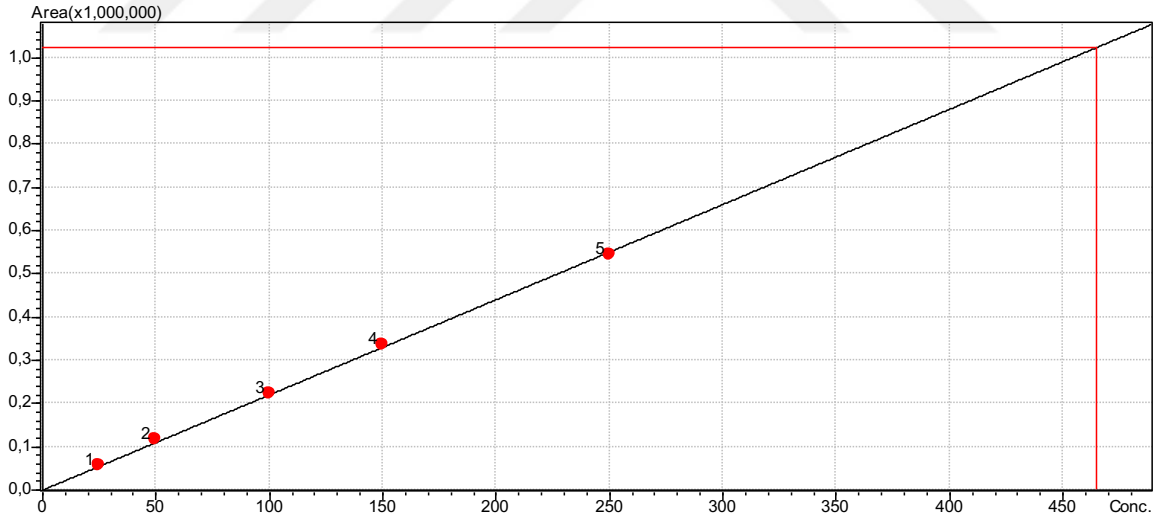
EK 10. 7,3',4'-trihidroksiizoflavon standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



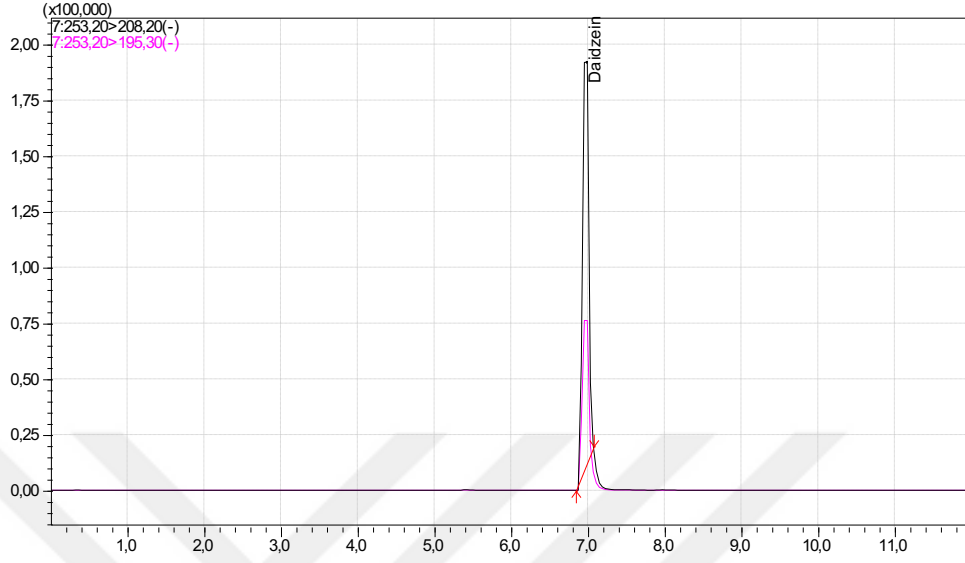
EK 11. 7,8,4'-trihidroksiizoflavon standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



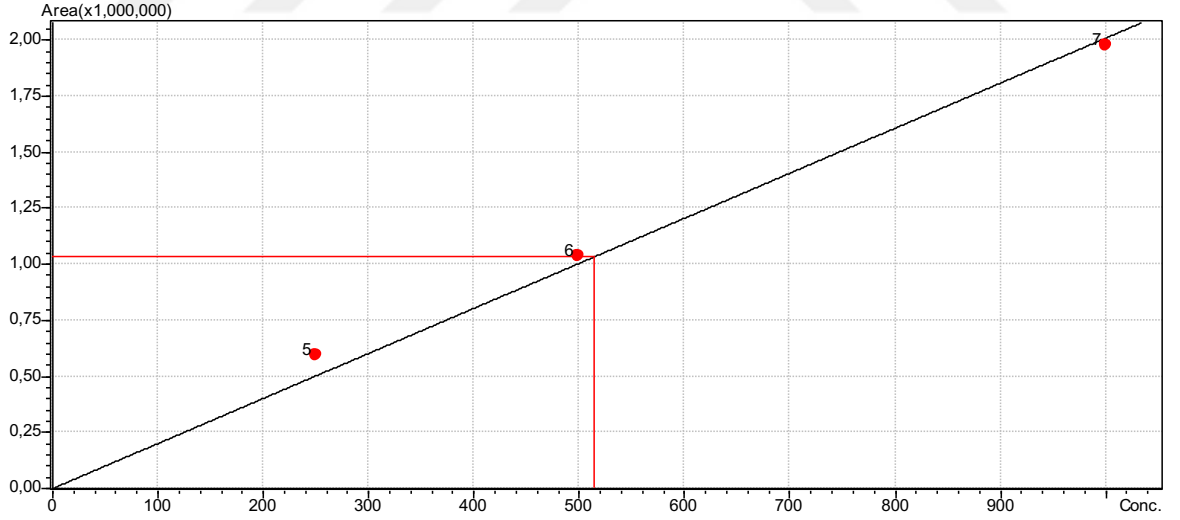
EK 12. 7,8,4'-trihidroksiizoflavon standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



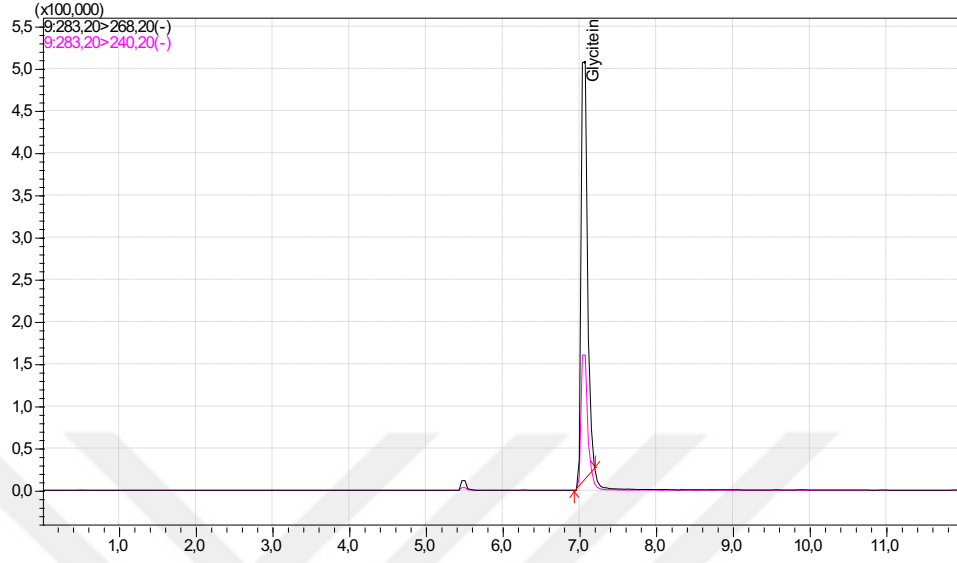
EK 13. Daidzein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



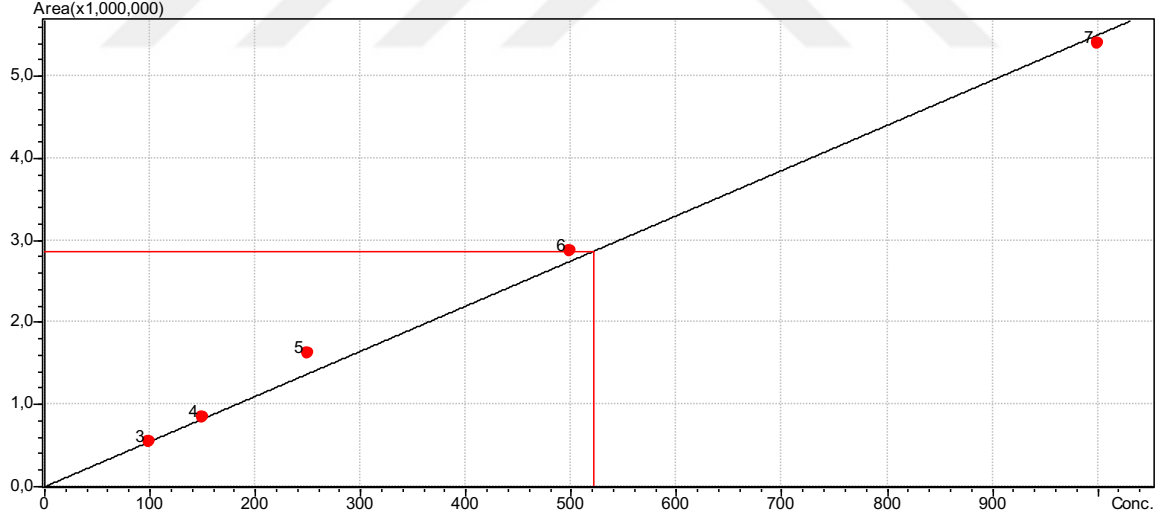
EK 14. Daidzein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



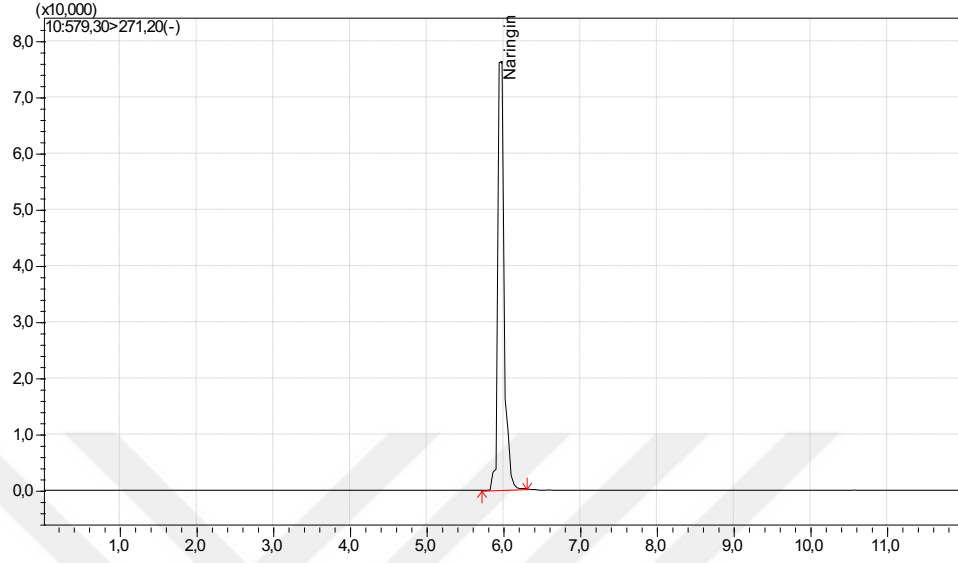
EK 15. Glisitein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



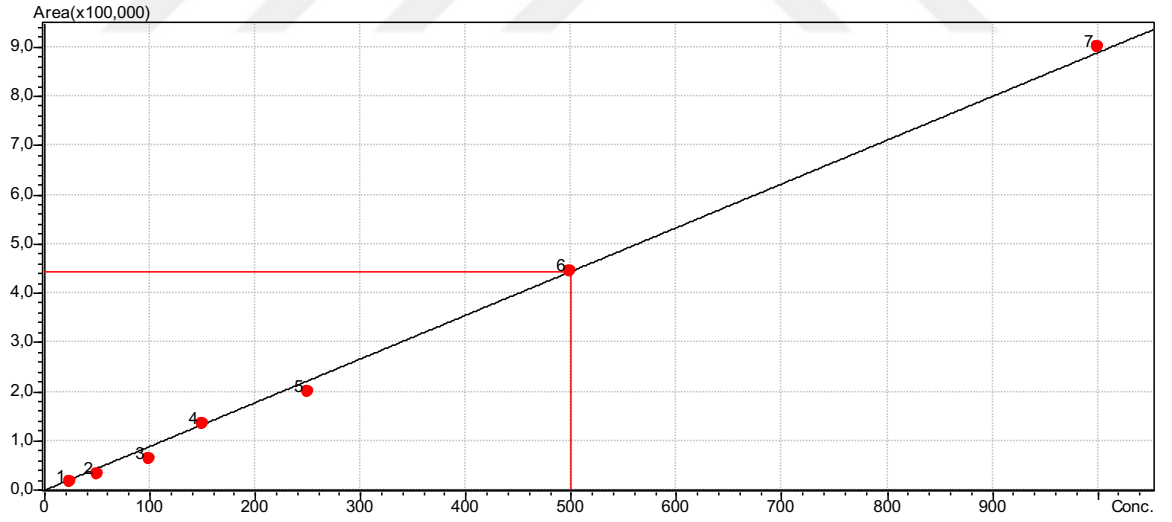
EK 16. Glisitein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



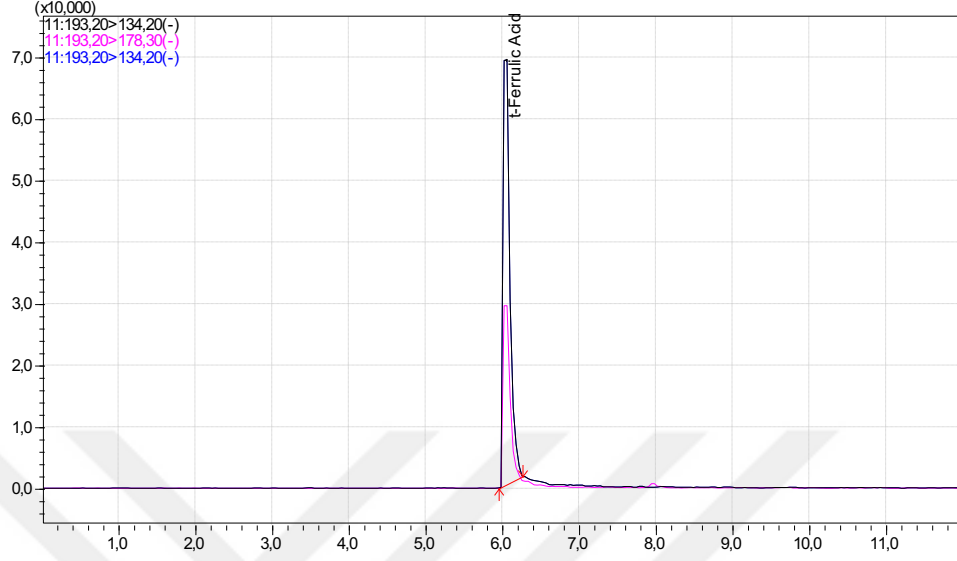
EK 17. Naringin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



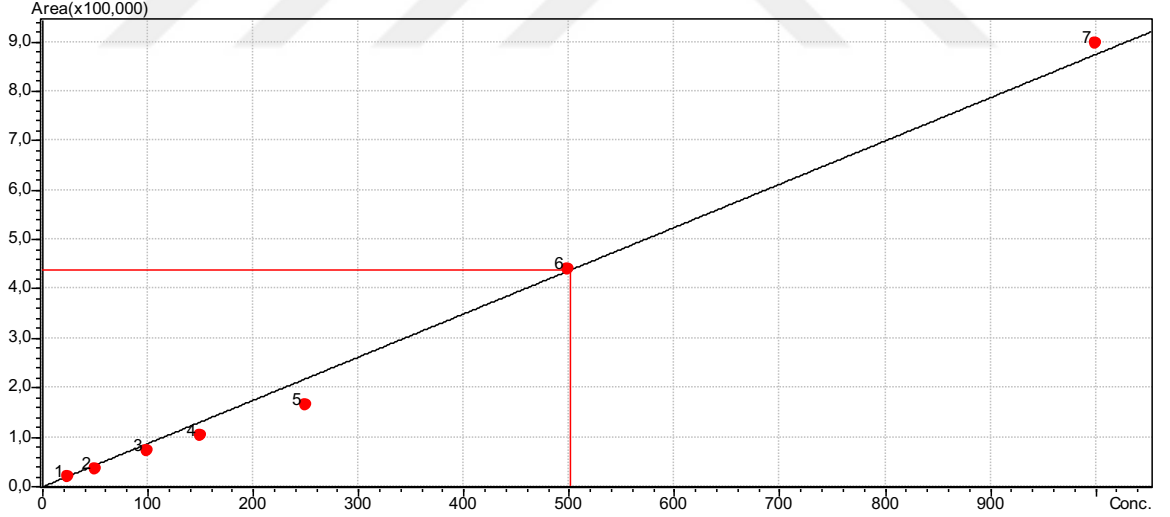
EK 18. Naringin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



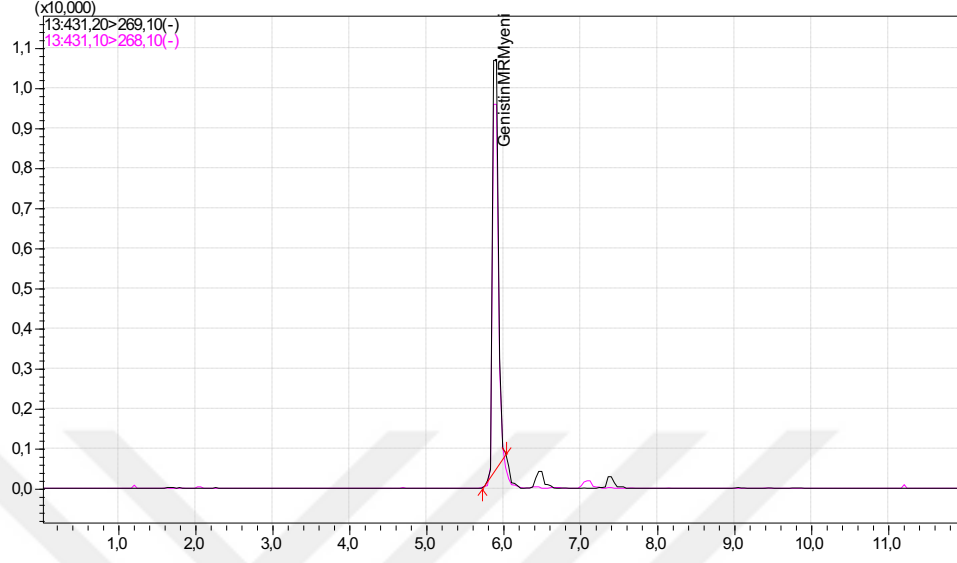
EK 19. Ferulik asit standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



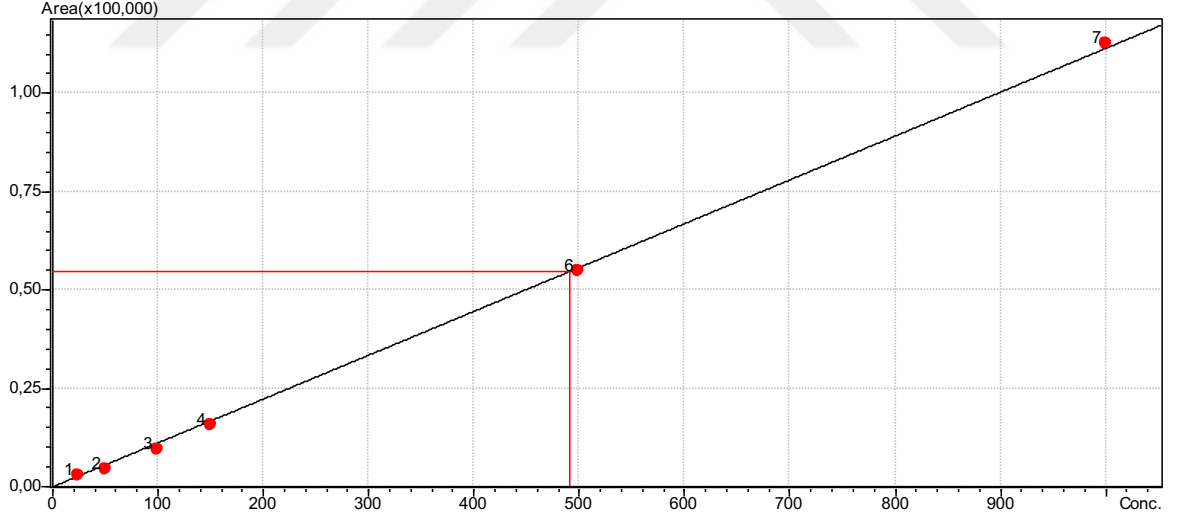
EK 20. Ferulik asit standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



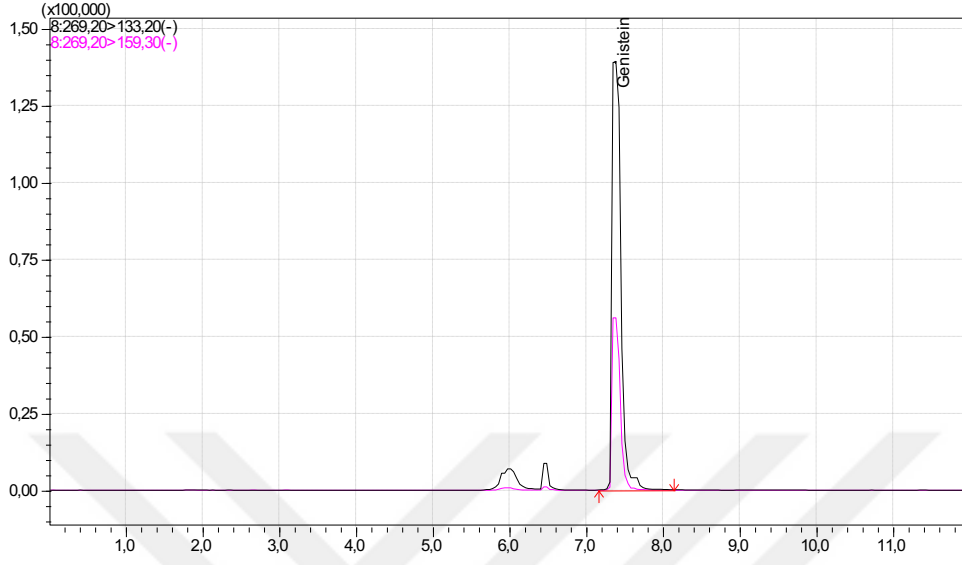
EK 21. Genistin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



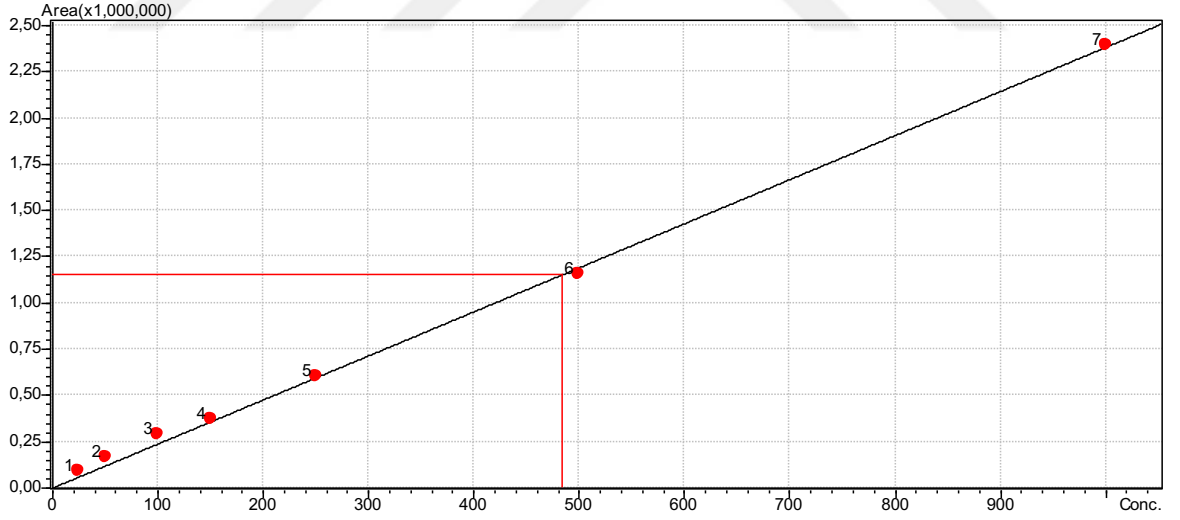
EK 22. Genistin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi



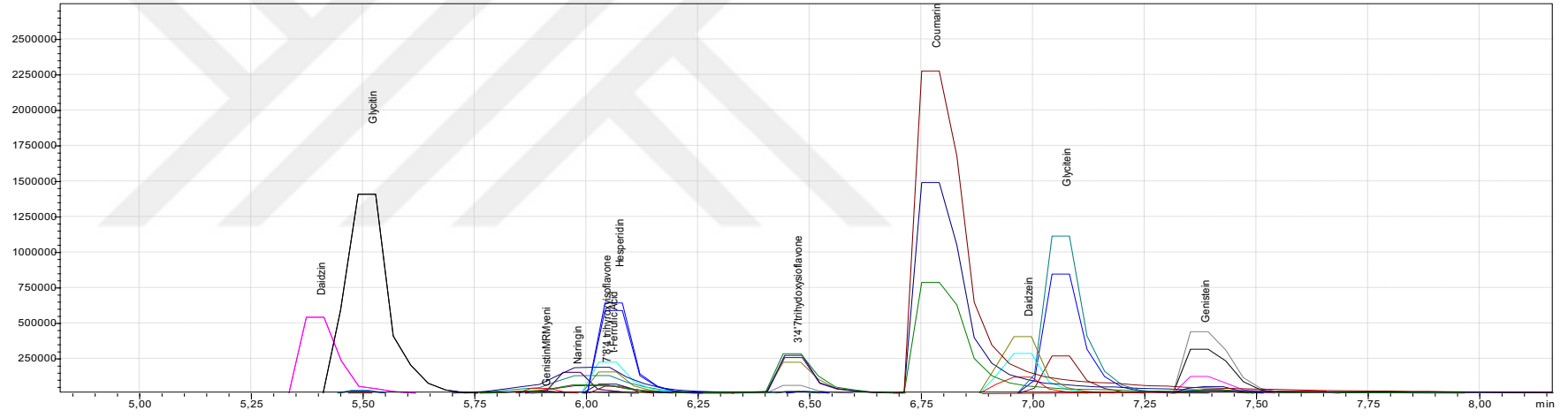
EK 23. Genistein standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisindeki 500 ppb konsantrasyonuna ait pik görünümü



EK 24. Genistin standartının LC-MS/MS kalibrasyon eğrisi

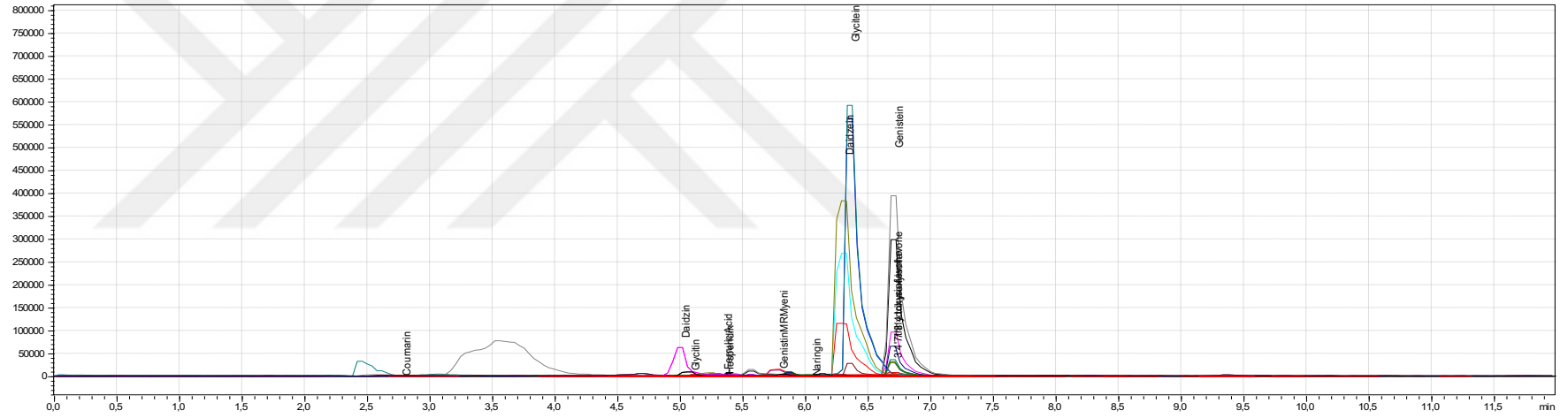


EK 25. Fenolik bileşik standartlarına ait toplam iyon kromatogramı

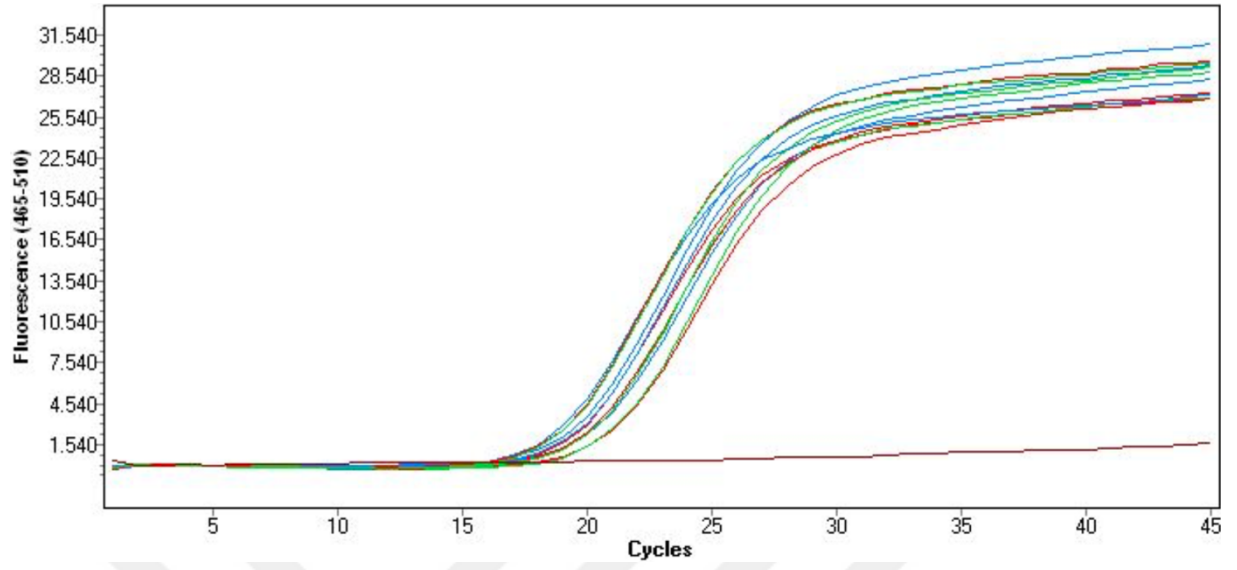


EK 26. Soya hücre ekstraktında belirlenen fenolik bileşiklerin toplam iyon kromatogramı

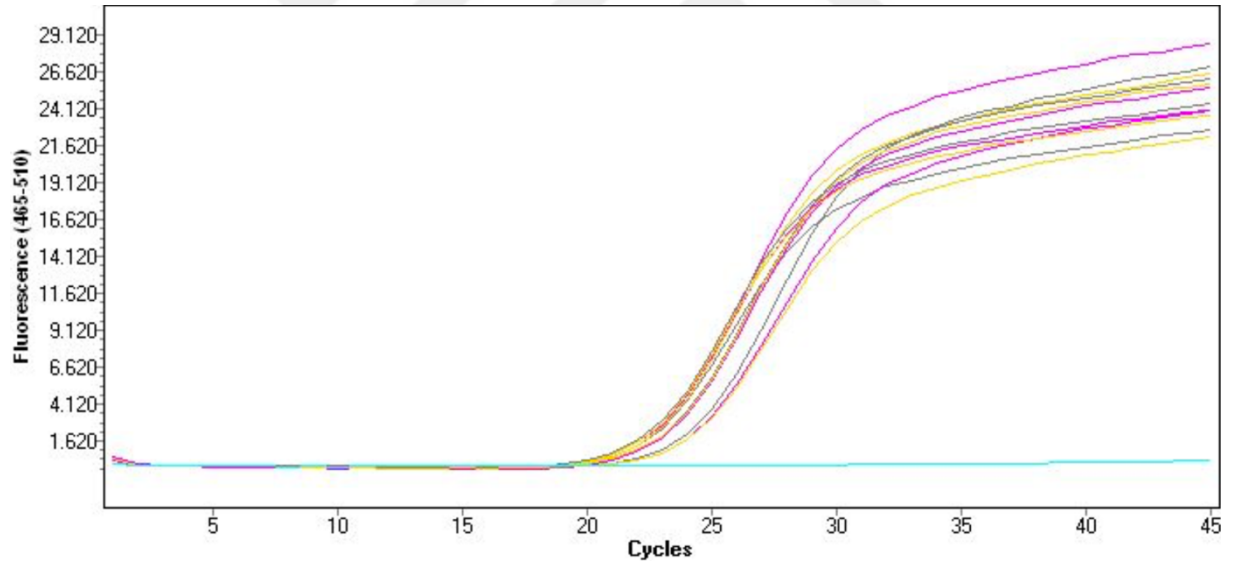
98



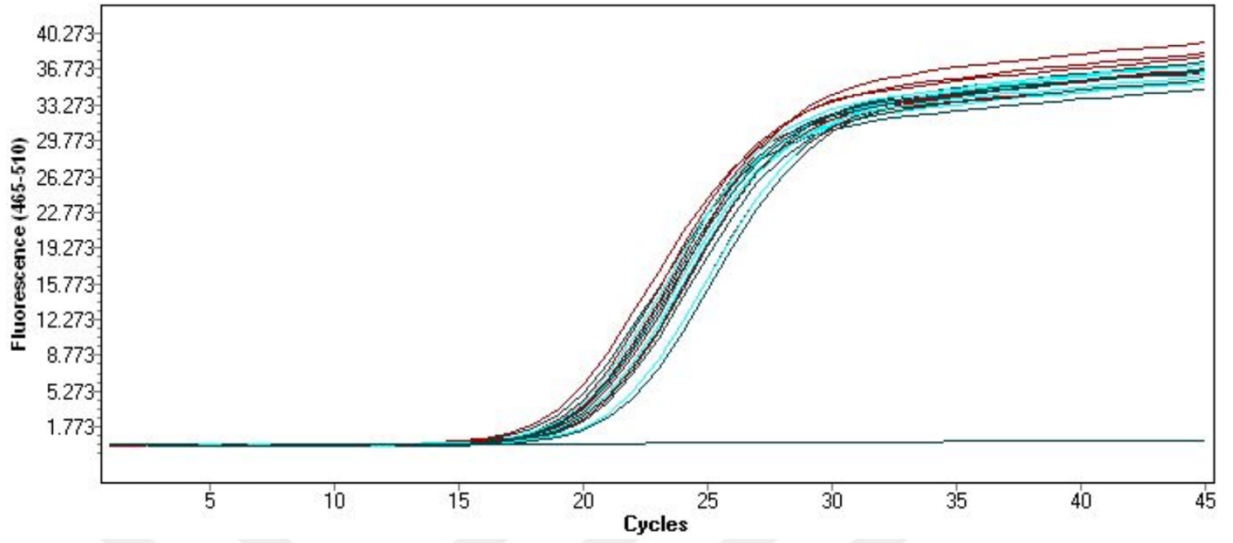
EK 27. Aktin Beta genine ait amplifikasyon eğrileri



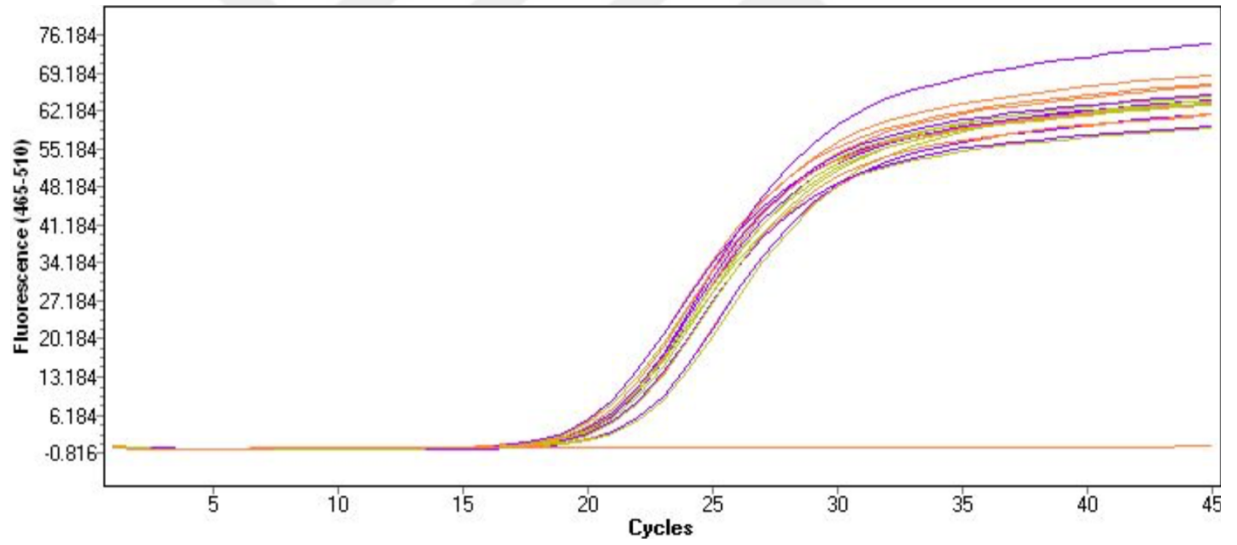
EK 28. TYR genine ait amplifikasyon eğrileri

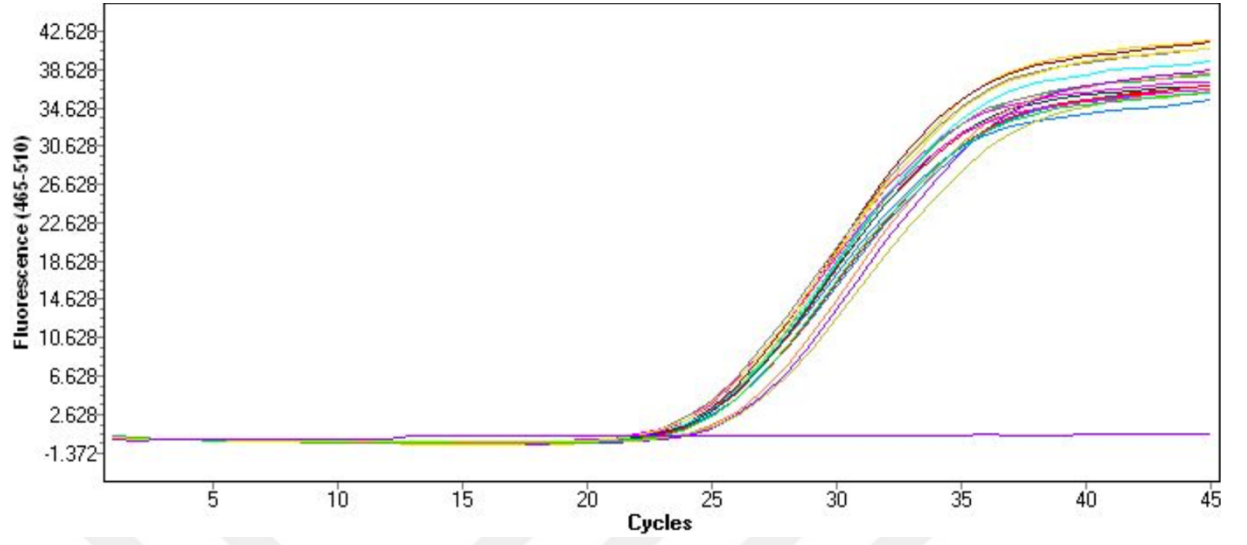


EK 29. TYRP1 genine ait amplifikasyon eğrileri



EK 30. TYRP2 genine ait amplifikasyon eğrileri



EK 31. MITF genine ait amplifikasyon eğrileri

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Yıldız BODURLAR
Doğum Yeri	KARABÜK
Doğum Tarihi	14.11.1987
Uyruğu	✓T.C. □ Diğer:
Telefon	536-2599600
E-Posta Adresi	bodurlar.y@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Uludağ Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	08.06.2009

Yüksek Lisans	
Üniversite	Anadolu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Zooloji Programı

Makale ve Bildiriler	
- Bodurlar, Y., Caliskan, M., 2019, Inhibitory activity of soybean cell culture extract on tyrosinase activity and melanin formation in A-msh induced B16-F10 melanoma cells, <i>Journal of Biochemistry and Biotechnology</i>, 2, 37. - Bodurlar, Y., Sivas, H. 2011, Carvacrol Inhibited the Growth and Induced the Apoptotic Morphology of Human Osteosarcoma (U-2 OS) Cells, <i>FEBS Journal</i>, 278 (Suppl. 1) 1–3. - Sivas, H., Bodurlar, Y. 2014, Carvacrol Changes the Expression Level of Genes Involved in MAPK Pathway in a Human Osteosarcoma Cell Line, <i>Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology</i>, 115 (1), 1–374.	