

**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

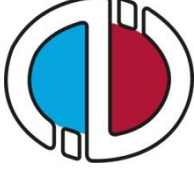
**YEŞİL KAHVENİN A549 VE SPC-212 KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ BİYOLOJİK ETKİLERİ**

**Tülin KORKMAZ
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE**

BİLECİK, 2016

Ref.No: 10102213



**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

**YEŞİL KAHVENİN A549 VE SPC-212 KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ BİYOLOJİK ETKİLERİ**

**Tülin KORKMAZ
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE**

BİLECİK, 2016



**ANADOLU UNIVERSITY
UNIVERSITY**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences
Department of Molecular Biology**

**THE BIOLOGICAL EFECETS OF THE GREEN
COFFEA ON THE A549 AND THE SPC-212 CANCER
CELLS**

**Tülin KORKMAZ
Master Of Science Thesis**

**Thesis Advisor
Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE**

BİLECİK, 2016



BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK LİSANS
JÜRİ ONAY FORMU**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 31.12.2015 tarih ve 51 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18.01.2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Tülin KORKMAZ'ın ".....
..... Yeşil Kahvenin A549 ve SPC-212 Kanser Hücreleri
..... Üzerindeki Biyolojik Etkileri....."
başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI): Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE

ÜYE: Doç. Dr. Cihan DARCAN

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Volkan KILIÇ

ÜYE: Doç. Dr. Figen ÇALISKAN

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI BAŞKANI:

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve/...../..... sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana laboratuvarını açıp, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE'ye teşekkür ederim.

Lisansım ve yüksek lisansım boyunca bana her konuda yardımcı olan, maddi ve manevi her anlamda yanımda olan, bu yolda ilerlerken bana tam anlamıyla ışık olan sevgili hocalarım Doç. Dr. Cihan DARCAN ve Yrd. Doç. Dr. Sema LEBLEBİCİ'ye en içten saygılarımı sunar sevgi ve minnetimi bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında bana destek olan laboratuvar arkadaşlarım Handan EMİŞOĞLU, Devrim GÜZEL, Akın AYDIN, Emine ERDAĞ, Reyhan VAROL ve Erhan ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans boyunca her anda yanımda olan her sıkıntımı paylaşarak azaltan sevgili dostlarım Biyolog Mine YAVUZ, Biyolog Sinem Deniz AKCA ve ailesine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana doğru yolu gösteren, her anımda yanımda olan, ilgi ve desteğini esirgemeyen en değerli varlıklarım sevgili annem Zeynep KORKMAZ, babam Ferzander KORKMAZ ve kardeşim Zafer KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Ekstraksiyon aşamasında bana destek olan sayın Osman Tuncay AĞAR'a ve akım sitometri çalışmalarımda bana yardımcı olan sevgili Şennur GÖRGÜLÜ'ye teşekkür ederim.

ÖZET

Kanserin önlenmesi ve tedavisi için araştırılan etken maddelerin sentetik kimyasallardan ziyade organik bileşenler olması tercih edilmektedir. Bu çalışmada, daha önce farklı yönlerden biyolojik aktiviteleri incelenmiş olan yeşil kahvenin ekstresi ve fraksiyonlarının A549 ve SPC-212 hücreleri üzerinde apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Yeşil kahve ekstre ve fraksiyonlarının sitotoksik etkileri MTT ve Nötral red boya alımı testleriyle belirlenmiş, hücre morfolojisindeki değişimler ise AO/EB çift boyama yöntemiyle floresan mikroskopta incelenmiş ve apoptotik indeks hesaplanmıştır. Hücre zarında meydana gelen değişim ise Anneksin V/FITC-PI boyaması yapılarak flow sitometride incelenmiştir. Kaspaz enzim aktivasyonu ise kaspaz-3,-8,-9 kolorimetrik kit kullanılarak elizada ölçülmüştür.

A549 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri; metanol ekstresinde 3 mg/ml, N-butanol, etil asetat ve sulu fraksiyonlarda, sırasıyla, 1, 0.45 ve 2.75 mg/ml ve demlenmiş yeşil kahvede ise 10 mg/ml dozlarında tespit edilmiştir. SPC-212 hücre hattında ise metanol ekstresinde 0.60 mg/ml, N-butanol, etil asetat ve sulu fraksiyonlarda yine sırasıyla, 0.30, 0.28 ve 0.80 mg/ml ve demlenmiş yeşil kahvede ise 5 mg/ml IC₅₀ değerleri olarak belirlenmiştir. Morfolojik görüntülere göre belirlenen apoptotik indeksler ise, etil asetat fraksiyonda, SPC-212’de % 25.20 ve A549’de, % 34.53’dir. Demlemede ise SPC-212’de % 19.40 ve A549’da % 36’dır. Anneksin V/FITC-PI boyaması sonucuna göre ise, A549 hücresinde etil asetat fraksiyonu ve demlemede sırasıyla % 28.7 ve % 32.4 oranında apoptotik hücre gözlemlenmiştir. SPC-212 hücrelerinde ise etil asetat fraksiyonunda %24.7, demlemede %31.2 oranında apoptotik hücrede gözlenmiştir. Kaspaz-8’in her iki hücrede de yaklaşık 1.5 katlık artışı dikkat çekmektedir.

Yeşil kahvenin ekstre ve 3 fraksiyonunun, A549 ve SPC-212 hücrelerinin proliferasyonunda azalmaya ve apoptoza sebep olduğu gözlenmiştir. Her iki hücre hattında da etil asetat fraksiyonunun ve demlenmiş yeşil kahvenin apoptoza etkisinin, diğerlerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İki hücre hattını karşılaştırdığımızda; SPC-212 hücrelerinin A549 hücrelerine göre sitotoksik ve apoptotik etkiler bakımından daha hassas olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Sitotoksite, A549, SPC 212, Yeşil Kahve.

ABSTRACT

It is preferred that the active ingredients investigated for prevention and treatment of cancer should be organic components rather than being synthetic chemicals. In this study, apoptotic effects of biological activities of green coffee extracts and fractions, previously examined in different aspects, on A549 and SPC-212 cells were investigated.

The cytotoxic effects of green coffee extracts and fractions were determined by means of MTT and neutral red dye uptake test and the changes in cell morphology were examined in a fluorescent microscope by using Dual AO/EB staining method and apoptotic index was calculated. The changes occurring in the cell membrane were examined in flow cytometry by doing Annexin V/FITC-PI staining. The activation of the caspase enzyme was measured in Eliza by using caspase-3-8-9 colorimetric kit.

IC₅₀ values in A549 cell line were determined as 3 mg/ml in methanol extract; 1, 0.45 and 2.75 mg/ml doses in N-butanol, ethyl acetate and aqueous fractions respectively and 10 mg/ml doses in brewed green coffee. IC₅₀ values in SPC-212 cell line were determined as 0.60 mg/ml in methanol extract; 0.30, 0.28 and 0.80 mg/ml in N-butanol, ethyl acetate and aqueous fractions, respectively and 5 mg/ml IC₅₀ in brewed green coffee. The apoptotic indexes determined according to the morphological images in the ethyl acetate fraction were 25.20 % in SPC-212 and 34.53% in A549. In brewed one, for SPC-212 it was 19.40 % and for A549 it was 36 %. According to the results of Annexin V / FITC-PI staining, in the ethyl acetate fraction and brewing of A549 cells, apoptotic cells were observed in rate of 28.7% and 32.4%, respectively. In SPC-212 cells, apoptotic cells were observed in the rate of 24.7 % in ethyl acetate and 31.2 % in brewing. It is noteworthy that there were approximately 1.5-fold increases in both cells of Caspase-8.

It was observed that extract and 3 fractions of green coffee caused reduction and apoptosis in proliferation of A549 and SPC-212 cells. It was determined that in both cell lines, the effect of acetate fraction and brewed green coffee to apoptosis was higher than the others. When comparing the two cell lines, it was found that SPC-212 cells were more sensitive than A549 cells in terms of cytotoxic and apoptotic effects.

Keywords: Cytotoxicity, A549, SPC 212, Green Tea.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

ÖZET..... I

ABSTRACT Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

İÇİNDEKİLER III

ÇİZELGE VE ŞEKİLLER DİZİNİ VI

SİMGELER VE KISLATMALAR DİZİNİ IX

1. GİRİŞ 1

1.1. Kahve..... 1

1.1.1. Yeşil kahve 1

1.2. Kanser..... 4

1.2.1. Kanser tanımı ve türleri..... 4

1.2.2. Kanser oluşum süreci (karsinogenez) 5

1.2.3. Kanserli hücrenin özellikleri 6

1.2.4. Kanserin sebepleri 7

1.3. Akciğer Kanseri..... 8

1.3.1. Akciğer kanserinin sıklığı ve yaygınlığı 8

1.3.2. Akciğer kanserinin sebepleri 8

1.3.3. Akciğer kanseri hücre tipleri 9

1.4. Mezotelyoma 9

1.4.1. Mezotelyomların türleri..... 10

1.4.2. Mezotelyoma etiyolojisi 10

1.4.2.1. Asbest..... 10

1.4.2.2. Erionite..... 11

1.4.2.3. SV40 simian virüs..... 11

1.5. Hücre Ölüm Mekanizmaları 12

1.5.1. Apoptotik hücre ölümü..... 12

1.5.1.1. Apoptozu indükleyen faktörler 12

1.5.1.2. Apoptotik hücre ölüm mekanizması 13

1.5.2. Nekrotik hücre ölümü.....	16
1.5.2.1. Nekrotik hücre ölüm mekanizması	17
1.5.3. Nekroptotik hücre ölümü	18
1.5.3.1. Nekroptotik hücre ölüm mekanizması	19
1.5.4. Apoptotik ve nekrotik hücreler arasındaki temel farklar	20
1.6. Kaspazlar	22
1.7. Anneksin V/FITC-PI (Propidiyum iyodür) Yöntemi ile Apoptoz Belirlenmesi	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
2.1. Materyal.....	23
2.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	23
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	23
2.1.3. Kullanılan test maddesi	23
2.1.4. Kültür hücreleri	24
2.1.5. Deneyde kullanılan ortam içerikleri ve hazırlanışları	25
2.2. Yöntem	27
2.2.1. Yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarının hazırlanma yöntemi	27
2.2.1.1. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması	28
2.2.2. Hücrelerin büyütülmesi	28
2.2.3. Sitotoksik etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	29
2.2.4. Sitotoksik etkinin Nötral kırmızısı (NK) yöntemi ile belirlenmesi.....	29
2.2.5. Apoptozun hücrelerdeki morfolojik incelenmesi	30
2.2.5.1. Akridin Oranj/Etidyum Bromid (AO/EB) çift boyama	30
2.2.6. Kaspaz-8, -9, -3 enzim aktivasyonunun belirlenmesi	31
2.2.7. Anneksin V/FITC -PI boyama yöntemi ile apoptoz analizi	32
2.2.8. İstatistiksel analiz	33
3. BULGULAR.....	34
3.1. Demlenmiş Yeşil Kahvenin Sitotoksik Aktiviteleri (Ön Çalışma)	34
3.2. Yeşil Kahve Metanol Ekstresi ve Diğer Fraksiyonlarda Verim Hesabı.....	35
3.3. Yeşil Kahve Ekstre ve Fraksiyonların Sitotoksik Aktiviteleri	35
3.3.1. A549 hücrelerindeki sitotoksik aktiviteler	35

3.3.2. SPC-212 hücrelerindeki sitotoksik aktiviteler.....	38
3.4. Apoptotik Aktivitenin Morfolojik İncelenmesi.....	40
3.4.1. AO/EB çift boyama yöntemi.....	40
3.4.1.1. Metanol ekstrelerinin A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi	42
3.4.1.2. N-Bütanol fraksiyonunun A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi	44
3.4.1.3. Etil asetat fraksiyonunun A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi.....	45
3.4.1.4. Sulu fraksiyonun A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi.....	46
3.4.1.5. Demlenmiş yeşil kahvenin A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi	47
3.4.1.6. Metanol ekstrelerinin SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi	50
3.4.1.7. N-bütanol fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi	52
3.4.1.8. Etil asetat fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi	53
3.4.1.9. Sulu fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi	54
3.4.1.10. Demlenmiş yeşil kahvenin SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi	55
3.5. Kaspaz Enzim Aktivasyonlarının Ölçülmesi	56
3.5.1. A549 hücreleri.....	56
3.5.2. SPC-212 hücreleri	57
3.6. Anneksin V/FITC-PI Analizi	58
3.6.1. A549 hücresi	59
3.6.2. SPC-212 hücresi.....	61
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	63
4.1. A549 ve SPC-212 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	63
4.2. A549 ve SPC-212 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik ve Morfolojik Etkilerinin Değerlendirilmesi	64
KAYNAKLAR	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Türkiyede mezotelyoma epidemiyolojisi ile ilgili çalışmaların özeti.	11
Çizelge 1.2. Apoptoz ve nekrozun farkları	21
Çizelge 2.1. Hücre hatlarında çalışılan yeşil kahve metanol ekstresi ve fraksiyonlarının konsantrasyonları	24
Çizelge 2.2. Hücre hatları üzerinde morfolojik etkinin çalışıldığı yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarının konsantrasyonları.....	31
Çizelge 2.3. A549 ve SPC-212 hücre hatlarında kaspaz -8,9,3 enzim aktivitelerini belirlemek için yeşil kahve ekstralarının uygulanan konsantrasyonları.....	32
Çizelge 2.4. A549 ve SPC-212 hücre hatlarında anneksin V/FITC yöntemi için uygulanan dozlar	33
Çizelge 3.1. Metanol ekstresi ve diğer fraksiyonların kuru ağırlık ve % verimleri.....	35
Çizelge 3.2. Yeşil kahve uygulanmış A549 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi..	59
Çizelge 3.3. Yeşil kahve uygulanmış SPC-212 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. <i>Coffea arabica</i> var. <i>typica</i> 'nın çiçek ve meyveleri.....	1
Şekil 1.2. Karsinogenezin oluşumu MMP; matriksmetaloproteinaz, L: lenfosit, NK: natu rel killer hücre, M: Mekanik faktörler, T: Trombosit, A: Adezyonmolekülü.....	6
Şekil 1.3. Genetik ve çevresel faktörlerin kansere katkısı (A), çevresel ve genetik faktör lerin bazı kanser riskleri üzerine etkisi (B), kanserlere yakalanmada başlıca çevresel fak- törlerin etki oranları.....	7
Şekil 1.4. Apoptozun iç ve dış yolağı.	16
Şekil 1.5. Nekrotik yolağın temel mekanizması.	18
Şekil 1.6. Apoptoz ve nekroptoz sinyal yolağı arasındaki bağlantı.....	20
Şekil 1.7. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik fark.....	21
Şekil 1.8. Apoptozun son aşaması, apoptotik cisimcikler	22
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan A549 hücre hattı	24
Şekil 2.2. Çalışmada kullanılan SPC-212 hücre hattı.....	25
Şekil 3.1. Demlenmiş yeşil kahvenin sitotoksik aktiviteleri.....	34
Şekil 3.2. A549 hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik aktiviteler.....	36
Şekil 3.3. SPC-212 hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik aktiviteler	39
Şekil 3.4. Yeşil kahve metanol ekstresi ve fraksiyonlarının A549 hücrelerindeki..... apoptotik, nekrotik ve ölü hücre indeksleri.....	41
Şekil 3.5. Metanol ekstresinin A549 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi	43
Şekil 3.6. N-Butanol fraksiyonunun A549 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi	44
Şekil 3.7. Etil asetat fraksiyonunun A549 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi	45
Şekil 3.8. Sulu fraksiyonun A549 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi.....	46

Şekil 3.9. Demlenmiş yeşil kahvenin A549 hücreesindeki apoptotik aktivitesi	47
Şekil 3.10. Yeşil kahve methanol ekstresi ve fraksiyonlarının SPC-212 hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve ölü hücre indeksleri.....	49
Şekil 3.11. Metanol ekstresinin SPC-212 hücreesindeki apoptotik aktivitesi.....	51
Şekil 3.12. Butanol fraksiyonunun SPC-212 hücreesindeki apoptotik aktivitesi.....	52
Şekil 3.13. Etil asetat fraksiyonunun SPC-212 hücreesindeki apoptotik aktivitesi.....	53
Şekil 3.14. Sulu fraksiyonun SPC-212 hücreesindeki apoptotik aktivitesi	54
Şekil 3.15. Demlenmiş yeşil kahvenin SPC-212 hücreesindeki apoptotik aktivitesi.	55
Şekil 3.16. Yeşil kahve ekstraktları uygulanan A549 hücrelerinde kaspaz aktivasyonu...	57
Şekil 3.17. Yeşil kahve ekstraktları uygulanan SPC-212 hücre hattında kaspaz aktivasyonu	58
Şekil 3.18. Yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarının uygulandığı A549 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI akım-sitometrik analizi.	60
Şekil 4.1. Kaspaz-8 enziminin apoptozdaki rolü	66

SİMGELER VE KISLATMALAR DİZİNİ

RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
AO	: Acridine Orange
EB	: Ethidium Bromide
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
PI	: Propidium Iodide
FBS	: Fetal Bovine Serum
EDTA	: Etilen-diamin tetra astetik asit
MTT	: 3-(4,5dimetiliazol-2yl)-2,5-difenil tetrozolyum bromid
PBS	: Phosphate buffer saline

1. GİRİŞ

1.1. Kahve

Kahve kökboyasigiller (Rubiaceae) familyasının *Coffea* cinsine mensup, yüksek rakımlardaki alanlarda yetişen çok yıllık tropik bir ağaçtır (Butt, M., vd., 2011; Duran, M., 2004). Bu tür; 5-8 metre yükseklikte, basit yapraklı, kışın yapraklarını dökmeyen, beyaz çiçekli ve kırmızı meyvesi olan bir ağaçtır (Şar, 2012). Isının 5⁰C'ye düştüğü yerlerde yetişmez (Baytop, 1999). Tohumları 8-12 mm uzunlukta ve 6-8 mm genişlikte olup, sert, soluk yeşil ve sarımtırak yeşil renkli, kokusu hafif, tatları ise acıdır (Şar, S., 2014; Baytop, T., 1999). Bu tropik türün tohumlarına ve tohumlarından yapılan içeceğe kahve denir (Duran, M., 2004). Kahveyi elde etmek için bitkinin olgun meyveleri 3-4 hafta güneşte kurutulur, kabuklarından ayrılınca nemli bir yerde birkaç gün bekletilip ardından yıkanır ve tekrar kurutulup makineler ile parlaklık verilir (Erdemir, 2001).

Çok sayıda kahve türü vardır. Ancak, ekonomik anlamda iki tanesi önemlidir; *Coffea arabica* (Şekil 1.1) ve *Coffea canephora* (robusta). Tarımı yapılan bu türlerin ilki Arap kahvesidir, daha çok Amerika'da yetiştirilmektedir. İkinci tür ise Doğu Afrika ve Kongo havzası kökenlidir. Günümüzde Afrika ve Madagaskar'da yetiştirilmektedir (Duran, 2004).



Şekil 1.1. *Coffea arabica* var. *typica*'nın çiçek ve meyveleri (Şar, 2012).

1.1.1. Yeşil kahve

Günlük hayatta tükettiğimiz kahve, temelde yeşil kahve çekirdeğinden elde edilir (Wei ve Tanokura, 2014). Yeşil kahve çekirdeğindeki tat veren öncüllerin bileşeni ve miktarı kahve içeceğinin kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Wei ve

Tanokura, 2014). Yeşil kahve tanesi yüksek sıcaklıkta kavrulduktan sonra istenilen tat ve aromaya kavuşur (Çağlarırnak ve Ünal, 1997).

Son yıllarda, yeşil kahvenin içeriği, çeşitli analitik teknikler kullanılarak, farklı hassasiyet ve özgünlükte tanımlanmaya çalışılmaktadır. 2DNMS'si (İki boyutlu nükleer manyetik rezonans spektroskopisi) aracılığıyla yeşil kahvenin suda çözünür bileşenleri belirlenmiştir. Yeşil kahvenin ana bileşenleri polisakkarit, lipid ve proteinlerdir. Bu bileşenler arasında; kafeoliquinik asit (CQA: klorojenik asit ailesinin bir üyesi), asetik asit, kafein, kolin, sitrik asit, L-glutamik asit, L-alanin, L-asparajin, quinik asit, malik asit, trigonellin, feruloilkinik asit, diğer organik asitler, sukroz, flavan, mannan, diğer polisakkaritler, mineraller, yağ asitleri ve diğer lipidler ile kahveo sayılabilir. Bunların yanı sıra; kafein, trigonellin, klorojenik asit, şeker (başta sukroz olmak üzere) ve serbest amino asitler azınlıkta olan bileşenleridir. Bu bileşenler, azınlıkta olsalar da kahvenin aroma kaynağı olduğu için önemlidirler (Wei ve Tanokura, 2014).

1. Kafein: Kahvenin acı tadını belirlemede 1,3,7-trimethylxanthine olarak da bilinen “kafein” önemlidir (Ramalakshmi ve Raghavan, 1999). Yeşil kahve çekirdeğindeki kafein içeriği türe göre değişiklik gösterir. Çevresel ve tarımsal faktörler kafein miktarında minimal bir etkiye sahiptir (Wei, vd., 2012). Pişirme sırasında kafein açısından önemli bir kayıp yoktur (Illy ve Viani, 1995). Kafein suda az çözünen bir maddedir ve hidrofobiktir, membrandan kolaylıkla geçer. Kafein bundan dolayı kolaylıkla gastrointestinal yolda absorbe edilebilir. Kafein'in %99'undan fazlası ağızdan tüketimin ardından absorbe edilir ve plazma pik seviyesi 15-45 dakikada elde edilir (Wei, vd., 2012).

2. Organik asitler: Organik asit seviyeleri yeşil kahve çekirdeklerinin türleri ve kökenlerine göre değişir (Wei, F., vd., 2012; Rogers, W. J., vd., 1999). Organik asitler farklı tür yeşil kahve çekirdeklerinin ayrımı için bir belirteç olarak düşünülebilir (Wei ve Tanokura, 2014). NMR (nükleer magnetik rezonans) kullanılarak yapılan yeşil kahve ekstraktlarının analizinde en çok sitrik asit, malik asit, quinik asit ve asetik asit gözlemlenir (Wei, vd., 2010).

a. Trigonellin: Trigonellin miktarı kahve türlerinin ayrımına yardımcıdır. Kahve çekirdeği olgunlaştıkça trigonellin miktarı çok az değişir (Clifford ve Kazi, 2004). Pişirme sırasında trigonellin ana bileşenleri olan N-methylpyridinium ve nikotinik asite ayrılır (Wei, F., vd., 2012; Stadler, R. H., vd., 2002).

b. Klorojenik asit: Sinamik (fenolik bileşik) asit ve quinic asit arasında oluşan ester sınıfına girerler. En yaygın sinamik asitler; kafeik asit, ferulik asit ve p-coumarik asittir. Yeşil kahve içerisinde en çok bulunan klorojenik asit caffeoylquinic asit izomerleridir. Caffeoylquinic asit izomerleri; 3-CQA (3-O-caffeoylquinic), 4-CQA (4-O-caffeoylquinic), 5-CQA (5-O-caffeoylquinic) (Jaiswal, vd., 2010). Klorojenik asit, yeşil kahve çekirdeği ve diğer meyve ve sebzelerde en çok bulunan polifenollerin biridir (Wei ve Tanokura, 2014). Diğer polifenoller gibi antioksidan, antiinflamatuar, antipiretik ve antineoplastik etkileri gösterilmiştir (Dos Santos, M. D., vd., 2006; Rao, C. V., vd., 1992).

3. Polisakkarit: Yeşil kahve çekirdeğinin kuru ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (Bradbury ve Halliday, 1990) ve başlıca üç polimerden oluşur: arabinogalaktan, manan ve selüloz (Wei, vd., 2011). Yeşil kahve çekirdeği kavrulduğunda polisakkaritlerin yapıları önemli derecede değişir. Kavurma işlemi karbonhidrat polimerlerini parçalar ve depolarizasyona, yapısal modifikasyona, proteinlerin ve protein fragmentlerinin, diğer parçalanmış ürünlerin yoğunlaşmış komplekslerinin oluşmasına sebep olur (Muller ve Hofmann, 2005).

a. Sükroz: Yeşil kahve çekirdeğinde en bol bulunan karbonhidrattır (Wei ve Tanokura, 2014). Yeşil kahve çekirdeğinin gelişimin erken evresinde sükroz sentezi yüksekken gelişimin son evrelerinde daha az gözlenir (Geromel, vd., 2006).

4. Protein ve aminoasitler: Proteinler, peptidler ve serbest aminoasitler yeşil kahve çekirdeğinde tat öncül molekülleridir. Kahve aromasının gelişmesi ve kahvenin renginin oluşması bir peptidin reaksiyonu sonucu olduğu düşünülür (Rogers, vd., 1999). Yeşil kahve çekirdeği ekstiresinde 29 tür serbest amino asit belirlenmiştir (Muller ve Hofmann, 2005). Bu aromada serbest amino asitlerin etkisinin olup olmadığı henüz kesin değildir. Ancak, farklı coğrafik bölgelerde yetişen yeşil kahve çekirdeklerinde farklı oranlarda gözlemlendiği için yeşil kahve çekirdeğinin coğrafik orijinini belirlemede kullanılabilir (Wei ve Tanokura, 2014).

5. Lipitler: Yeşil kahve çekirdeğinde lipit içeriği triasilgliserol, sterol ve tokoferollerden oluşur. Lipitlerin çoğu yeşil kahve çekirdeğinin endosperminde yer alırken, sadece küçük bir kısmı çekirdeğin mumsu dış tabakasında bulunmaktadır (Wei ve Tanokura, 2014).

1.2. Kanser

1.2.1. Kanser tanımı ve türleri

Hücreler iç ve dış etkenler sonucunda seri bir şekilde bölünmeye başlar, bu bölünme ile birlikte bir doku kitlesi meydana gelir ve “tümör” olarak adlandırılır (Aliustaoğlu, 2009). Meydana gelen her tümör kanser değildir, benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) özellik gösterebilir. Benign tümörler organizmada yayılmaz, belirli bir bölgede kalır, ölümcül değildir. Ancak, zamanla malign tümöre dönüşebilir. Malign tümörler, civar dokulara invazyon yaparak ya da kan/lenf yoluyla metastaz yaparak organizma içerisinde dağılır, bu durum organizmayı ölüme sürükler (Player, A., vd., 2004; Hanahan, D., vd., 2000; Naumov, G. N., vd., 2006).

Kalıtsal ya da somatik bir seri mutasyon sonucu oluşan kanser, hücrelerin normal özelliklerini kaybederek; morfolojisini, bölünmesini, yenilenmesini ve ölümünü etkileyecek anormal özellikler kazanmasına sebep olan geniş bir hastalık grubudur. Kanserli hücreler, sağlıklı komşu dokulara yayılabilir (invazyon) ve/veya dolaşıma geçerek uzak dokulara göç edebilir (metastaz). Kanserlin yaş, cinsiyet ve coğrafik koşullarla ilgili birçok tipi olabilir ve tüm yaştaki insanları etkileyebilir (Ferlay, J., vd., 2010; Jemal, A., vd., 2011; Altıntaş, Z., vd., 2013; Rieger, P. T., 2004). Kanserli hücreler metabolik ve davranışsal olarak bir takım değişiklik geçirir. Bu değişiklikler; immün sistemden korunma, zamansız ve sınırsız çoğalma, diğer dokulara yayılmanın yanı sıra, bazı morfolojik değişiklikler ve apoptoz sinyallerini algılamama şeklinde karmaşık ve çok adımlı bir süreçlerle meydana gelmektedir (Vatansever, 2014). Clark’a (1991) göre kanser; sınırsız büyüme gösteren, çevre dokuları istila eden ve bu dokulara yerleşerek büyüeyebilen anormal hücre topluluğudur. Kan ve lenf yolu ile metastaz yapabilirler. Bu özellikler bir lezyonun kanser olarak adlandırılabilceğini gösterir (Clark, 1991).

Kanser, çoğunlukla ortaya çıktığı hücre tipi veya organa göre isimlendirilir. Kanser tipleri geniş bir kategoride sınıflandırılabilir.

- Karsinoma: İç organlarda veya deride,
- Sarkoma: Kemikte ve bununla bağlantılı dokularda,
- Lösemi: Kan dokularında,
- Lenfoma ve miyaloma: İmmün sistem hücrelerinde,
- Merkezi sinir sistemi kanserleri: Beyin ve omurilik dokularında

- Adenoma: Salgı bezi hücrelerinde
- Blastoma: Blastema’da embriyonik hücrelerde meydana gelir (Anand vd. 2008)

Temel olarak; mezenşimal dokulardan köken alan sarkomalar, epitelyal dokulardan köken alan karsinomalar, hemapoetik ve lenfoid sistemlerden köken alan lenfomalar olmak üzere kanserin 3 tipi bulunmaktadır (Gandini vd., 2009).

1.2.2. Kanser oluşum süreci (karsinogenez)

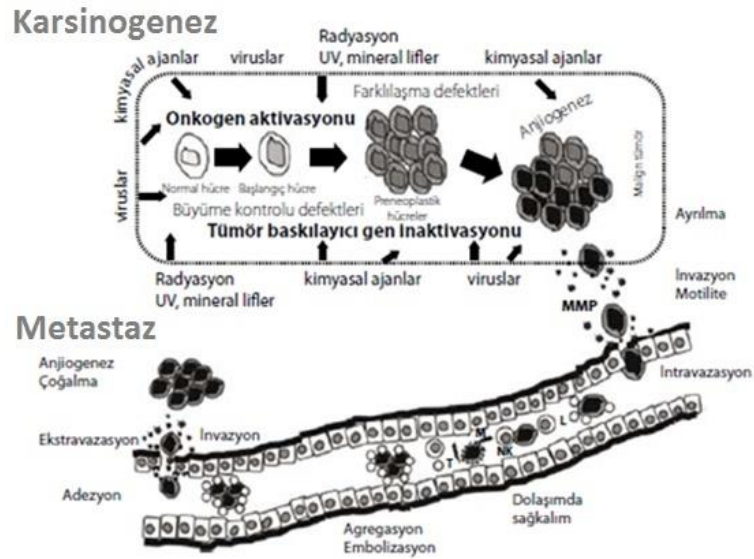
Normal hücreler, bir takım hücresel, genetik ve epigenetik değişiklikler geçirerek kanserli hücreye dönüşürler. Bu dönüşüm süreci 3 aşamada gerçekleşir;

- Başlama (Initiation)
- Gelişme (Promotion)
- İlerleme (Progression) (Martinez, J. D., vd., 2003; Oliveira, P. A., vd., 2007)

Başlama (Initiation): Tek bir hücrenin DNA’sında oluşan mutasyonlar ya da diğer genetik anomaliler, protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı, hücrenin büyümesi ve çoğalması arasındaki dengeyi bozabilmektedir. Bu aşamada, DNA hasarları enzimatik mekanizmalar ile tamir edilebilir. Başlama sürecinde, bölünen hücreler fenotip olarak birbirinin simetrisidir. Ancak, sonrasında hücreler hem genotip hem de fenotip özellikleri bakımından değişerek neoplastik yapıya dönüşebilirler.

Gelişme (Promotion): Başlangıç evresinden farklı olarak, yavaş ilerleyen bir süreçtir. DNA yapısı henüz değişmemiş normal hücreler, hormonlar ve büyüme faktörleri gibi tümör geliştirici faktörlerle tümör hücresine dönüşebilir.

İlerleme (Progression): İlerleme süreci geri dönüşümü olmayan bir süreçtir. Hücrelerde biriken mutasyon onların invazif ve malign olmasına sebep olur, proliferasyonlarında artış görülür. Bu aşamada, hücreler genellikle hızlı büyüme, bölünme, genetik kararsızlık, invazyon, metastaz, biyokimyasal ve metabolik işlevlerde anomaliler ve morfolojik değişiklikler ile karakterize edilir (Martinez, J. D., vd., 2003; Farber, E., 1984; Oliviera, P. A., vd., 2007; Trosko, J. E., 2003). Karsinogenez ve metastaz mekanizması Şekil 1.2.’de özetlenmiştir.



Şekil 1.2. Karsinogenezin oluşumu **MMP**; matriksmetaloproteinaz, **L**: lenfosit, **NK**: naturel killer hücre, **M**: Mekanik faktörler, **T**: Trombosit, **A**: Adezyon molekülü (İçli ve Akbulut, 2005).

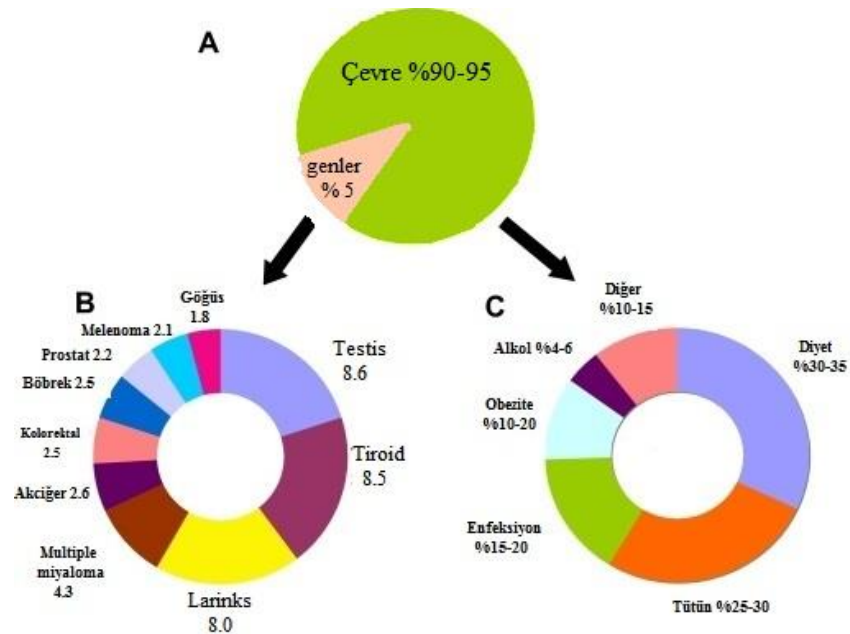
1.2.3. Kanserli hücrenin özellikleri

Kanserli ve normal hücrelerdeki farklar;

- Normal hücreler homeostaziyi korumak için büyümeyi durduran faktörlere cevap verirken kanserli hücreler veremez.
- Normal hücreler DNA hasarında apoptoza giderken, kanserli hücreler apoptozdan kaçır.
- Normal hücreler kromozomların uçlarındaki telomerlerden dolayı sınırlı bir şekilde bölünürken, kanserli hücreler telomeraz enzimi ile telomerlerin kısılmasını engeller ve sınırsız olarak bölünürler.
- Normal hücreler var olan kan damarları ile oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılayabilirken, kanserli hücreler hızla çoğaldıkları için tümörün iç kısımları oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılayamaz, anjiyogenesizi uyarıp yeni damar yapılarının oluşmasını sağlarlar.
- Normal hücreler bulundukları bölgede tutunarak yaşarlar, kanserli hücreler ise metastaz ile organizmanın değişik bölgelerine göç edebilirler (Weaver, R. F., vd., 1997; Pecorino, L., 2008; Weinberg, R. A., 2007; Lammers, T., 2010).

1.2.4. Kanserin sebepleri

Kanser oluşumuna sebep olan maddelere “karsinojen” adı verilmektedir (Chan, D. W., vd., 1994; Henderson, B. E., vd., 1991). Kansere sebep olan faktörler; iç ve dış faktörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Gutiérrez ve Salsamendi, 2001). Yaş, genetik yatkınlık, immün sistem hasarı, serbest radikaller ve bireyin hormonal durumu kansere sebep olan iç faktörlere örnek verilebilir. Beslenme ve yaşam tarzı, sigara ve alkol kullanımı gibi kişisel alışkanlıklar, enfeksiyonlar, radyasyon, çalışma ortamında ya da dış çevrede doğal veya sentetik toksik kimyasallara maruziyet, yiyeceklerde bulunan katkı maddeleri ve UV ışınları da kansere sebep olan dış faktörlerdendir (Gutiérrez, J. B., vd., 2001; Minamoto, T., vd, 2000; Lutz, W., 2002; Ohshima, H., vd., 2003,2005). Organizmada meydana gelen reaksiyonlar sonucu üretilen serbest radikaller, DNA ile etkileşerek gen mutasyonuna ve mutant genlerin ifadesi ile oluşan işlevsel ve yapısal olarak kusurlu proteinlere ve kromozomal bozukluklara sebep olur (Park, vd., 2005). İnsan papilloma virüsü (serviks ve deri kanseri), hepatit B virüsü (hepatokarsinoma) gibi onkojen virüsler insan kanserlerinde önemli rol oynar (Zur hausen, H., 1994; Robinson, W., 1994). Kansere neden olan genetik ve çevresel faktörler Şekil 1.3.’de özetlenmiştir.



Şekil 1.3. Genetik ve çevresel faktörlerin kansere katkısı (A), çevresel ve genetik faktörlerin bazı kanser riskleri üzerine etkisi (B), kanserlere yakalanmada başlıca çevresel faktörlerin etki oranları (Anand, vd., 2008).

1.3. Akciğer Kanseri

1.3.1. Akciğer kanserinin sıklığı ve yaygınlığı

Akciğer kanseri her yıl 2.3 milyon hasta sayısına ve bir milyon ölüm oranına sahip dünyadaki en yaygın malignant kanser türüdür (Parkin, 2001, Harmsma, vd., 2013). Dünya nüfusu arttıkça akciğer kanserinin büyük bir sağlık sorunu olarak kalmaya devam edeceği bilinmektedir (Altıntaş, Z., vd., 2013; Tas, F., vd., 2011). Günümüzde artık kadınlarda da yaygınlığı artmıştır (Payne, S., 2001; Tas, F., vd., 2011). 1950'lerde yapılan iki çalışmada; akciğer kanserinin, %71 oranıyla, en önemli etiyolojik faktörlerinden birinin sigara içmek olduğu belirlenmiştir (Hadju, vd., 2011, Winkler, vd., 2013). Orta ve düşük gelirli ülkelerde tütün kullanımı kaynaklı ölümlerin önümüzdeki yıllarda daha da artacağı düşünülmektedir (Harmsma vd., 2013; Payne, 2001). Türk Toraks Derneği tarafından Türkiye'de yapılan çalışmalarda akciğer kanserli kadınların %17'si erkeklerin ise %94'ünün sigara içtikleri bildirilmiştir (Akkoçlu ve Öztürk, 1999). Türkiye'de akciğer kanserinin yaklaşık görülme sıklığı, bölgelere göre sırayla; Akdeniz Bölgesi %41, Ege Bölgesi %40, Marmara Bölgesi %27, İç Anadolu Bölgesi %23, Doğu Anadolu Bölgesi %21, Güneydoğu Anadolu Bölgesi %18 oranındadır (Çavdar ve Ekim, 1999). Dünya Sağlık Örgütü ise tütün ile ilişkili hastalıkların 2030'a kadar 10 milyona ulaşacağını öngörmektedir (Payne, 2001).

1.3.2. Akciğer kanserinin sebepleri

Akciğer kanserinin sigaradan başka birçok sebebi vardır ve bunların başında, mesleki olarak maruz kalınan kimyasallar ve ışınlar gelmektedir. Bunlardan biri radon-222'dir. Renksiz ve kokusuz olan, toprak ve kayalarda bulunan, radyum-226 ve uranyum-238 ürünlerinin parçalanması ile doğal olarak oluşan radyoaktif bir soy gazdır. Akciğer kanserinin %10-14'ünden sorumlu olduğu bilinir (Hadju, S. I., vd., 2011; Alavanja, M. C. R., 2002) ve en yaygın kaynağı, inşaat yapımında kullanılan beton ve topraklardır (Alberg, A. J., vd., 2005; L'Abbé, K. A., vd., 1991). Radyoaktif çürüme ürünleri polonyum, bizmut ve kurşun, akciğer epitel hücrelerine oldukça zararlıdır. Serbest radikallerin üretimiyle birlikte, pulmoner epitel hücrelerde doğrudan DNA ile etkileşir.

Akciğer kanserinin diğer bir sebebi ise asbest'dir. Amyant olarak da bilinen bu madde, dayanıklı lifli yapıda kanserojen bir mineraldir. Anadolu'nun birçok yöresinde halk tarafından bilinçsizce kullanılmaktadır. Yöre halkının evsel kullanımı dışında,

endüstri alanında da kullanılmaktadır ve çalışanlar için oldukça zararlıdır. Kansere neden olan asbest'in Türkiye'de üretimi, kullanımı ve asbest içeren eşyaların piyasaya sunumu, 2010 tarihinden itibaren, Çevre ve Orman Bakanlığı Çevre Yönetimi Genel Müdürlüğü tarafından yasaklanmıştır (<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/08/20100829-3.htm>). Bunların dışında, endüstride kullanılan silika, kadmium, formaldehit, arsenik ve nikel gibi birçok maddeye maruz kalınması ile akciğer kanseri arasında ilişki olduğu da saptanmıştır (Hadju, S. I., vd., 2011; Bonne, C., 1939).

1.3.3. Akciğer kanseri hücre tipleri

Akciğer kanseri epitel hücrelerden türemiş karsinomdur (Lango vd., 2011). “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC; Non Small Cell Lung Cancer)” ve “küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC; Small Cell Lung Cancer)” olmak üzere iki tipi vardır. SCLC; oldukça malignant bir hastalıktır ve sigara ile yakından ilişkilidir. Hastaların yaklaşık olarak %60'ında metastaza uğradıktan sonra teşhis edilmekte ve tedaviyle ortalama yaşama süresi 18-24 aydır (Desmond ve Carney, 2002). NSCLC; akciğer kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturur, büyümesi ve yayılması SCLC'den daha yavaştır ve çok zayıf bir prognoza sahiptir. Sadece hastaların %14'ü teşhisten sonra 5 yıl hayatta kalabilir (Ginsberg, R. J., vd., 2001; Evans, T. L., vd., 2001). Adenokarsinoma, skuamoz-hücreli karsinoma, büyük hücreli karsinoma olmak üzere üç alt tipi vardır (Ginsberg vd., 2001). NSCLC'nin yaklaşık olarak %80'i tütün ürünlerinden, %20'si de diğer karsinojenlerden (asbestos, radon, hava kirliliği v.b) kaynaklanmaktadır (Ginsberg vd., 2001). Bu etmenler, zamanla onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyona sebep olur (Ferrone ve Molt, 2003).

1.4. Mezotelyoma

Organizmada potansiyel boşluklar olan plevral, periton, perikard ve testis kılıfının yüzeyi tek kat kübik veya yassı hücrelerden oluşan mezotelyum ile kaplanmıştır. Mezotelyumun benign ve malign tümörleri ‘mezotelyoma’ olarak adlandırılır (Öztek, 1997). Plevral tümörlerden ilk söz edenler 1767'de Lieutant ve 1819'da Laennect olmuştur (Milano, 1990). 1908'de Adamy ise ‘mezotelyoma’ adını ilk kez kullanmıştır (Briselli ve Mark, 1981). 1908'de Miller ve Wynn peritonda, 1927'de Maksimow plevrada doku kültürü çalışmaları ile serozal yüzey hücrelerinin fibroblastlara dönüştüğünü bunların epitelyal ve fibroblastik özellikte olduğunu göstermiştir (Seggewiss, H., vd., 1986; Canter, D., vd., 1980; Milano, M. T., 1990).

Stout ve Murray da doku kültürü çalışmaları ile plevral tümörlerin mezotelyal hücrelerden kaynaklandığını ortaya koymuştur (Milano, 1990).

1.4.1. Mezotelyomların türleri

Mezotelyomlar patolojik olarak 6 türe ayrılır;

- Epitelyal
- Fibröz
- Mikst (bifazik)
- Small cell
- Hemangiopensitomatöz
- Andiferansiye (Öztek, 1997).

Epitelyal: Gerçek mezotelyal kökenli tümörlerdir. Lokal ya da difüz benign ya da malign olabilirler. Benign ya da lokal olanlar zamanla malign ya da difüz olabilirler.

Fibröz (sarkomatoid): Fibroblastik diferansiyasyon gösteren mezotelyumlardan ya da submezotelyal fibroblastik hücrelerden gelişir. İğsi yapıdadırlar. Lokal, difüz benign ya da malign türleri vardır.

Mikst (bifazik): Tümör belirgin fibröz bir stroma içindeki epitelyal hücrelerden oluşur. Özellikle epitelyal ve sarkomatoid hücreler bir arada görülür.

Small cell: Epitelyal hücre özelliği taşıyan bu tümör hafif asidofilik, yuvarlak ya da poligonal stoplazmalı, yuvarlak nükleuslu hücrelerden oluşur. Daha çok malign yapıda olup nükleoller belirsiz, oval, çentikli, irice ya da çift nükleuslu, mitoz gösteren hücrelerdir.

Hemangioperisitomatöz: Epitelyal ya da fibröz tür hücrelerde boşlukları döşedikleri, damarların etrafında lokalize olma durumudur.

Andiferansiye tür: Anaplastik yapıdaki epitelyal ya da fibröz hücrelerce oluşturulur (Öztek, 1997).

1.4.2. Mezotelyoma etiyolojisi

Mezotelyoma sebebi olarak asbest, erionit ve SV40 virüsü bilinmektedir (Carbone, M., vd., 2002; Zamani, A., vd., 2014).

1.4.2.1. Asbest

Mesleki ve çevresel olarak asbest ile temasda olan bir çok insanda %90 oranında plevral malign mezotelyomaya gözlenmiştir. Ülkemizde asbest madenleri

bulunmaktadır. Bu madenlerden çevreye yayılarak insanlar üzerine etki etmektedir. Sanayide (tekstil, çimento ve inşaat, otomotiv, boya vb.), ham madde olarak kullanılmasıyla ve bunun yanısıra sigara filtresinden bebek pudrasına kadar günlük hayatta sürekli kullanılan malzemelerin içeriğinde bulunması insanlar üzerinde oldukça fazla risk oluşturur. Çizelge 1.1’de Türkiye’de mezotelyoma epidemiyolojisi ile ilgili çalışmaların özeti verilmiştir (Zamani, 2014). Asbest hücrenin mitotik sürecini etkiler, aktif oksijen türlerinin oluşmasını artırarak DNA hasarına sebep olur. Yapılan çalışmalarda mezotelial hücrelerde DNA kırıklarına sebep olduğu gözlenmiştir. Karyotip analizlerinde 1, 2, 3, 6, 7, 9, 11 ve 22. kromozomları kapsayan anomaliler gösterilmiştir (Başara, 2006).

Çizelge 1.1. Türkiyede mezotelyoma epidemiyolojisi ile ilgili çalışmaların özeti (Zamani, 2014).

Çalışma yeri	Yıl	Hız	Çalışma özelliği
İzmir	2001	E: 0.7/100,000 K: 0.3/100,000	Genel popülasyon. İzmir Kanser Kayıt verisi (KIDEM); mortalite
Karain	1975-1978	11 ölüm	Erionit temaslı 575 kişilik bir popülasyon
Karain, Tuzköy	1979-2003	% 44.5	Erionite temaslı köylerde orantılı ölüm oranı
Karain		E: 639/100,000 K: 1267/100,000	Erionit temaslılarda mortalite
Eskişehir		E: 114.8/100,000 K: 159.8/100,000	Asbest temaslı kişilerde mortalite. Genel popülasyonla karşılaştırıldığında; erkekler 88.3, kadınlar 799 kez daha risikli.
Diyarbakır		22.8/100,000	Genel popülasyonda mortalite
Maden, Ergani, Çüngüş, Çermik, Siverek	1990-1999	42.9/1,000 000	Asbest temaslılarda mortalite
Karaçi / Isparta	2005	1/132	Asbest temaslı 132 kişide prevalans
Çaparkayı/ Çankırı	1988-	4/425 (4 yıllık)	Asbest temaslı 425 kişide mortalite
Hekimhan Arguvan/ Malatya	2005	1.45/100,000 7.46/100,000	Asbest temaslılarda mortalite
Sivas	2010	3 olgu	2,970 taranan kişide prevalans

1.4.2.2. Erionite

Mezotelyomaya neden olduğu bilinen diğer bir çevresel kaynaklı, lifsi mineral erionitedir. Erionite asbest gibi fibröz silikattır ve volkanik bir üründür. Ürgüp civarında taş-kaya tabakalarında doğal olarak bulunur. Yöre insanı tarafından Akkuşak taşı olarak adlandırılır, hafif ve gözenekli olan bu taş, ev duvarlarının yalıtımında kullanılır. Bu taşların yüksek kanser riski taşıdığı özellikle de mezotelyoma riski oluşturduğu literatürde yer almaktadır (Krismann, M., vd., 2002; Tiainen, M., vd., 1992).

1.4.2.3. SV40 simian virüs

İnsan mezotel hücrelerinin SV40 enfeksiyonuna duyarlı olduğu ve bu virüsün

insan mezotel doku kültürlerinde malign trasformasyona neden olduğu bilinmektedir (Zamani, 2014). SV40 virüsü p53 ve pRb bağlanarak inaktifleştirirken; c-met, IGD-I ve diğer onkogenlere bağlanarak aktifleştirir (Bocchetta, M., vd., 2008; Carbone, M., vd., 2012). Kültür ortamında insan mezotel hücreleri hem asbest hemde SV40'a maruz bırakıldığında sinerjik bir etki göstererek yüksek oranda transforme olmuştur (Kroczyńska, B., vd., 2006; Bocchetta, M., vd., 2000).

1.5. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Üç tip hücre ölümü vardır. Bunlar; patolojik hücre ölümü olarak bilinen nekroz, olarak bilinen apoptoz ve otofajik hücre ölümüdür (Golstein ve Kroemer, 2006). Ayrıca, morfolojik ve biyokimyasal olarak temel hücre ölüm tiplerinden farklılık gösteren hücre ölüm tipleri de bildirilmiştir (Çoşkun ve Özgür, 2011).

1.5.1. Apoptotik hücre ölümü

Çok hücreli organizmalarda, metabolizma ve canlılığın devam ettiği sürece homeostaziyi korumak için hücre yapımı ve yıkımı arasında bir denge vardır ve bu dengeyi koruyan mekanizma da programlı hücre ölümüdür. Apoptoz olarak da bilinen programlı hücre ölümü (PCD), 1972' de J.F. Kerr tarafından nekrozdan farklı bir hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Wyllie, A. H., vd., 1980; Kerr, J. F., vd., 1972; Elmore, S., 2007; Liu, Z., vd., 2010; Altunkanyak, B. Z., 2008). Yaşam döngüsüne baktığımızda; embriyogenez, doku ve organ oluşumu, yaşlanma süreci, menstrual döngü, emzirme dönemi sonrası meme kanallarının geri çekilmesi, viral enfeksiyonlar da dahil diğer hastalıklar ve DNA hasarı gibi birçok biyolojik süreçte karşımıza çıkmaktadır (Yang, L., 2005; Elegbed, F., 2003; Ekshyyan, O., vd., 2004; Cameron, R., vd., 2000, Saikumar, vd., 1999).

1.5.1.1. Apoptozu indükleyen faktörler

Hücreyi apoptozu sürükleyen nedenler çeşitlidir. Bunlar:

- Hücre yüzeyinde bulunan hücre ölüm reseptörlerinin (Fas ve TNFR-1) ilgili ligantları ile etkileşime girmesi
- Genotoksik ajanların (ilaçlar, kimyasallar, UV ışınları) etkisi ile yaratılan DNA hasarı
- Reaktif oksijen türleri'nin (ROS) hem hücre hem de mitokondiri membranında oluşturduğu hasarlar
- Büyüme faktörlerinin ortamda azalması

- Granzim A ve B uyarımı
- Hücre membranında bulunan sifingomiyelinin çeşitli etkenlerle seramide dönüşmesi ve seramid'ten oluşan sifingoizinler apoptozu indükleyen sebepler arasındadır (Akşit, H., vd., 2008; Ulukaya, E., vd., 2011; Solakoğlu, Z., 2009, Engin, K., vd., 2001).

1.5.1.2. Apoptotik hücre ölüm mekanizması

Hücre apoptotik yola girebilmesi için 3 farklı şekilde uyarılır;

- İç yolak (mitokondri bağımlı yolak)
- Dış yolak (reseptör bağımlı yolak)
- Perforin/Granzim A ve B uyarımlı apoptoz (Eröz, vd., 2012, Liu, vd., 2010)

İÇ YOLAK

- **Uyarılma**
- Mitokondri bağımlı yolak da denen bu süreç, DNA hasarı, hormon eksikliği ve bazı büyüme faktörlerinin azlığı ile uyarılır (Pınarbaşı, 2007).
- **Düzenlenme**
- İç yolağı pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelere sahip *Bcl-2/Bax* gen ailesi düzenler (Salakoğlu, Z., 2009; Akşit, H., vd., 2008). **Bcl-2/Bax gen ailesinin;**
- Anti-apoptotik üyeleri; *Bcl-2* ve *Bcl-xL*,
- Pro-apoptotik üyeleri ise; *Bax, Bad, Bim, Bid, Noxa, Bak* ve *Bcl-xs*'dir (Ulukaya, vd., 2011).
- **Anti-apoptotik:**
- Mitokondri zarları arasında hücre ölümünü başlatan proteinler vardır (Pınarbaşı, 2007).
- **Pro-apoptotik:**
- Hücre çeşitli faktörlerle uyarıldığında, anti-apoptotik üyelerin (*Bcl-2* ve *Bcl-xL*) baskılanmasını sağlayarak mitokondri iç ve dış zar arasındaki apoptoz başlatıcı proteinlerin sitoplazmaya salınımını başlatırlar (Zimmerman, K. C., vd., 2001; Engin, K., vd., 2001; Saikumar, P., 1999; Ulukaya, E., vd., 2011).
- **Kaspaz Bağımlı Yolak**
- Sitokrom C stoplazmada bulunan Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör) ile birleşerek ATP varlığında, "apoptozom" oluşumunu sağlar ve kaspaz yolağını başlatır.
- Apoptozom, inaktif kaspaz-9'u aktif hale getirir ve aktif kaspaz-9 ise kaspaz-3 ve 7'yi aktifleştirir (Letai, A., vd., 2002; Stennicke, H. R., 1999; Pop, C., vd., 2006; Zhang, Z. H., vd., 2003; Cruchten, S. V., vd., 2002; Alosi, J., vd., 2010; Hockenbery, D., vd., 1990)
- **Kaspaz Bağımsız Yolak**
- Diğer bir pro-apoptotik grup ise apoptoz uyarıcı faktor (AIF), endonükleaz G, kaspaz aktif deoksiribonükleazlar (CAD) dır.
- Bunlar hücreyi ölüme hazırlayan proteinlerdir, Sitokrom C den daha geç salınırlar, apoptotik sürecin tamamlanmasını rol oynarlar.
- AIF çekirdeğe gider ve DNA'nın küçük parçalara ayrılmasını neden olur.
- Endonükleaz G kromatin yoğunlaşmasına neden olur
- AIF ve Endonükleaz kaspazdan bağımsızdır.
- CAD ve inhibitörü ICAD kompleksini oluşturmuştur.
- CAD bir DNaz olduğu için serbest kaldığında kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonuna sebep olur
- Aktif kaspaz-3 ICAD'ı keserek CAD'ı serbest bırakır (Yıldırım, A., vd., 2007; Sakahira, H., vd., 1998; Eröz, R., vd., 2012).

DIŞ YOLAK

- **Uyarılma**
- Hücre yüzeyinde Fas (APO-1, CD95) ve TNFR-1 (Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1) hücre ölüm reseptörleri bulunmaktadır.
- FasL ve TNF ligantları ilgili reseptörleri uyarır ve apoptoz süreci başlatılır (Liu, Y., vd., 2006; Lewin, B., 1997).
- **DISC Oluşumu**
- Ölüm reseptörleri uyarıldıktan sonra Fas reseptörü FADD (Fas-ilişkili ölüm bölgesi) ile, TNFR-1 reseptörü ise TRADD (TNFR-1- ilişkili ölüm bölgesi) ile etkileşime girer (Nagata, 1997).
- Burada oluşan sinyal kompleksine “ölümü tetikleyen sinyal kompleksi” (DISC; Death-Inducing Signaling Complex) denir (Singh, vd., 2010).
- **Kaspaz Şelalesi**
- Oluşan sinyal kompleksi prokaspaz-8' i aktifleştirir. Aktifleşen kaspaz-8, kaspaz-3, -6 ve -7' yi aktifleştirerek kaspaz şelalesini harekete geçirir.
- Aktif kaspaz-8, pro-apoptotik protein olan Bid'in aktifleşmesini tetikler ve aktif Bid, mitokondriden sitokrom C, SMAC gibi proteinlerin salınımını sağlayarak mitokondri yolağını aktifleştirmiş olur (Boatright, K. M., vd., 2003; Donepudi, M., vd., 2003; Ulukaya, E., vd., 2011).

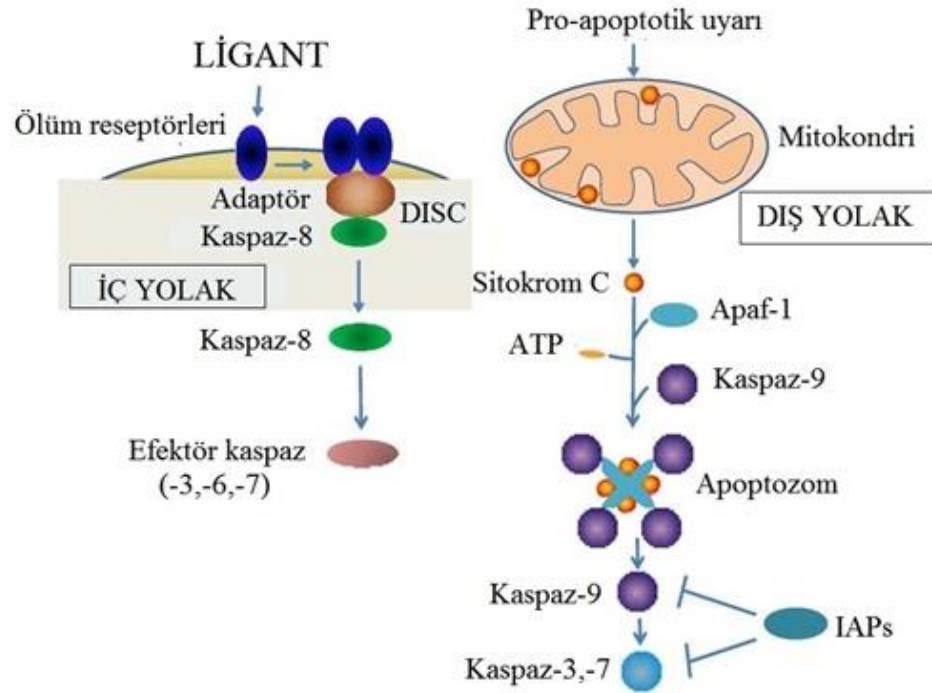
GRANZİM A UYARIMLI APOPTOZ

- Granzim A yolu kaspaz bağımlı hücre ölüm yolunu aktifleştirir.
- Granzim A proteaz kompleksi parçalar böylece NM23-H1'in inhibasyonunu serbest bırakır buda apoptotik DNA parçalanmasına yol açar (Lieberman ve Fan, 2003).

GRANZİM B UYARIMLI APOPTOZ

- Sitotoksik T lenfositler (CTL), konakçı hücre yüzeyindeki antijenleri tanırlar ve bu sırada, yüzeylerinde Fas ligant oluşturarak Fas reseptörüne tutunurlar.
- CTL'ler sitoplazmalarında Granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen apoptoz indükleyici protein içeren stoplazmik granüllere sahiptirler (Budd, 2002).
- Bu CTL'ler, perforin ile por oluşturarak hedef hücrede kaspazları aktifleştirecek granzim B salgırlar.
- Böylece, virus tarafından enfekte edilmiş hücre ya da tümör hücresi üzerinde sitotoksik bir etki sağlayabilirler (Trapani ve Smyth, 2002).

Apoptotik hücre ölüm mekanizmaları Şekil 1.4’de özetlenmiştir.



Şekil 1.4. Apoptozun iç ve dış yolağı (Li and Sheng, 2012).

1.5.2. Nekrotik hücre ölümü

Nekroz; yaşayan dokuların hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, enfeksiyon, UV ışını gibi dış fiziksel sebepler ya da toksin gibi kimyasallar etkisiyle otolize uğraması, parçalanmasına sebep olan patolojik bir ölüm şeklidir (Purokuryakov, 2003).

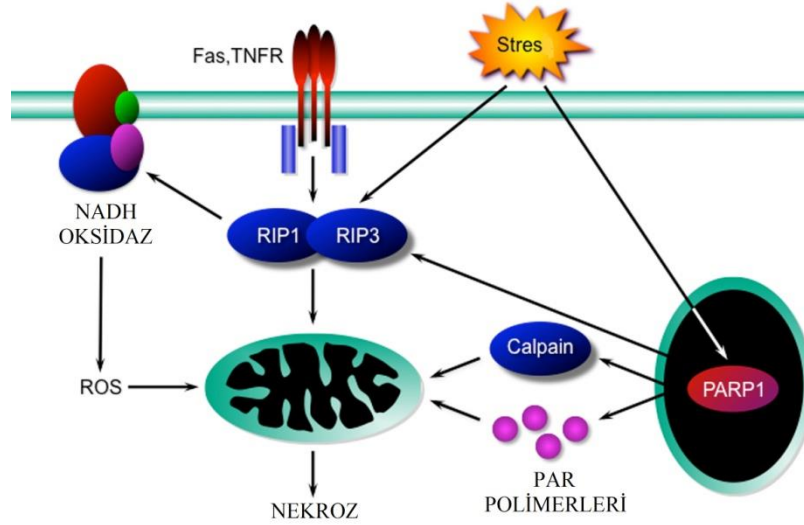
Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar hücrenin iyon dengesini bozar. DNA tamirinden sorumlu nükleer enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz), NAD^+ 'ı ikiye bölerek NAD kaybına neden olur. Bu durumda, ATP eksikliği iyon pompası yetersizliğine yol açar ve böylece hücre sıvı olarak organelleriyle birlikte şişer, plazma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basınç nedeniyle hücre patlar. Hücre ölümü, hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması yani enflamasyon (yangı) olayına sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliği, makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göçeden bu hücreler nekrotik dokuyu fagozite eder. Bu nedenle, enflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir (Golstein, P., 2007; Nicotera, P., vd., 2004).

1.5.2.1. Nekrotik hücre ölüm mekanizması

Nekroz bazı sebeplerden dolayı tetiklenmektedir. Bunlar; TNF reseptörleri ve bu aileye ait diğer reseptörlerin (FAS, TRAIL), purinojenik reseptörlerin, N-metil D-aspartat (NMDA) gibi eksitoreseptörlerin ligandlarıyla uyarılması, DNA hasarına neden olan doğrudan (radyasyon, antikanser ilaçları) ya da dolaylı sebepler ve oksidatif stress (iskemi/reperfusion, ROS)'dir.

Kütlesel DNA kırıkları PARP'ın (Poli ADP-Riboz Polimeraz, DNA tamirinden sorumlu nükleer enzim) aktivasyonundan dolayı oluşur. PARP'ın substratı NAD⁺ dır ve PARP, NAD'ı tükettiği için ATP eksikliğine sebep olur ve nekroza yol açar (Puroskuryakov, vd., 2003). Hücrel stress sonucunda, RIP1 ve RIP3 (receptor-interacting serine-threonine kinase 1 and 3) aktifleşir. Bu proteinler mitokondriyi ya doğrudan aktifleştirir ya da NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile dolaylı olarak nekrozu uyarır (Hengartner, vd., 1992). Nekrotik uyarı ayrıca, PARP'ı aktifleştirir. PARP1 de; kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PAR polimerazlar yoluyla nekroza neden olur. Kalpain, Ca⁺⁺ ile aktif olan kaspaz proteaz ailesi üyesidir ve lizozomal enzim salınımına neden olan kathepsin aktivasyonuna katkıda bulunur.

Bcl-2 ailesinin bir diğer protein olan BNIP, direk olarak mitokondriyal por oluşumunu aktif eder. Mitokondriyal porlar; mitokondrinin dış membranında VDAC (voltaj bağımlı anyon kanalı), iç zarında ANT (Adenin nukleotit translokaz), matrikste peptidil prolil izomeraz siklofilin D'den oluşur. Mitokondri porları, aşırı ROS ve Ca⁺⁺ üretiminde açılan geniş kanallardır (Baines, C. P., 2010; Zong, W. X., vd., 2006). (Nicotera, P., vd., 2004; Baines, C. P., 2010; Zong, W. X., 2006). Aşırı Ca⁺⁺ ve ROS artışı mitokondri porlarının uzun süre açık kalmasına neden olur. Bu durumda hücre oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretmez hale gelir ve nekroz gerçekleşir (Baines, C. P., 2010; Zong, W. X., vd., 2006). Nekrotik hücre ölüm mekanizması Şekil 1.5'de özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Nekrotik yolağın temel mekanizması (<http://agscientific.com/blog/index.php/tag/necroptosis/>).

1.5.3. Nekroptotik hücre ölümü

Nekroz, apoptozun aksine kalıplaşmış bir morfoloji sergilemez, hücre ölümünün düzensiz bir şekli olarak ifade edilir (Galluzzi ve Kroemer, 2008). Ancak Hitomi vd. (2008), bu durumun aksine programlanmış bir nekrozun moleküler yolağının varlığını rapor etmişlerdir (Hitomi, vd., 2008). Birçok kanıt nekrozun programlanabilir bir olay olduğunu gösterir (Galluzzi and Kroemer, 2008). Nekrotik hücre ölümü, plazma membran reseptörlerine bağlanan ligantlar tarafından indüklenebilir ve genetik, epigenetik, farmakolojik faktörler aracılığıyla düzenlenebilir (Galluzzi and Kroemer, 2008).

Nekroptoz; farmakolojik ve genetik olarak kaspazın inhibe olduğu durumlarda, TNF- α 'nın aktifleşmesi ile oluşan kontrollü nekrotik hücre ölüm yolağıdır (Degterev, vd. 2005). Nekroptoz, nekrozun özelliklerini gösterir, fakat TNF- α , FasL ve TRAIL tarafından uyarılan nekroptoz, nekrosteinler tarafından inhibe edilebilen ve RIP1 ve RIP3'ün katıldığı bir sinyal yolağı sergiler (Wu, vd., 2011). Nekrostatin, RIPK1'i baskılayarak programlı nekrotik hücre ölümünü, engelleyen bir moleküldür (Xie, vd., 2013). Önceden, ölüm reseptörlerinin sadece apoptozu uyardığı düşünülürken son zamanlardaki araştırmalar, ölüm reseptörlerinin apoptoz engellendiği zaman RIP1'in dahil olduğu nekroptoz yolağını uyardığını göstermiştir (Holler, vd., 2000).

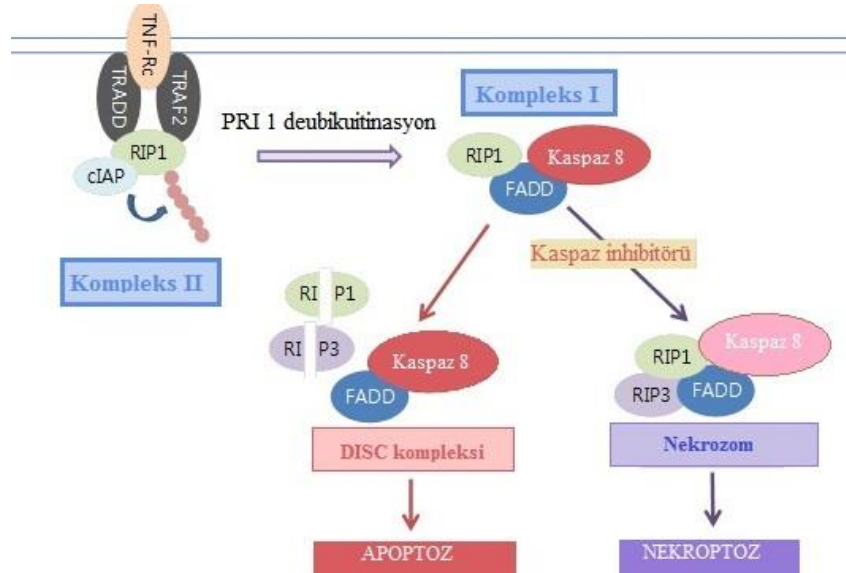
1.5.3.1. Nekroptotik hücre ölüm mekanizması

Nekroptoz hücre ölüm reseptörleri tarafından uyarılır (Wu, vd., 2011). TNF- α aktif makrofajlar tarafından üretilir (Chen and Goeddel, 2002). Yaygın olarak apoptotik indükleyici olarak düşünülse de ilk kez tümör hücre nekrozuna sebep olan bir ajan olarak tanımlanmıştır. Yeni kanıtlar, TNF- α 'nın progranlanmış nekrozu indüklediğini ortaya koymaktadır (Wu, vd., 2011).

- TNFR1 ve TNFR2 hücre yüzeyinde yerleşmiş TNF- α 'nın özgün reseptörleridir (Wu, vd., 2011).
- Başlangıçta, TNF- α TNFR1'in hücre dışında kalan bölgesine bağlanır ve hücre içine bakan kısmında allosterik bir değişiklik yaratır (Andera, 2009).
- Apoptoz proteinlerin inhibitörleri (cIAP1 ve cIAP2), TNF- α reseptör ilişkili faktor 2/5 (TRAF2/5), E3 ubiquitin ligaz, Fas ilişkili ölüm domaini (FADD), RIP1, TRADD (TNF- α reseptörle ilişkili ölüm domain) ile oluşturulan kompleks I aracılığıyla TNFR1 ve TNFR2 aşağı yönlü sinyali tetikler. RIP1'in ubiquinasyonu IKK kompleksi ve NEMO aktivasyonunu başlatarak NF- κ B yolağının aktivasyonunu artırır.
- Bu durumun tersi ise NF- κ B yolağını inhibe edip, hücre ölüm yolağına doğru eğilime sebep olur (Wu, vd., 2011).
- Siklindromatos (CYLD) tümör supresör gen tarafından kodlanır ve birkaç protein ile NF- κ B'nin aktivasyonunu bloklar (Kovalenko, vd.,2003).
- Tümör hücreleri proliferasyonu arttıran ve apoptozis oranını azaltan inaktif CYLD taşır (Alameda, J. P., vd., 2010, Urbanik, T., vd., 2011).
- RIP1 kompleks I den ayrılır ve kompleks II'ye katılır. TNFR1'in aktivasyonu, kompleks II'nin oluşumu için esastır. TNFR1'in aktivasyonunun inhibe edilmesi de hücrede apoptoz direncine sebep olur (Schneider-Brachert, vd.,2006).
- Ölümlü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinen kompleks II, kaspaz-8, TRADD, FADD ve RIP1'den oluşur. CYLD'nin knoc-down olması, TNF'nin uyardığı nekroptozu inhibe eder (Hitomi, vd., 2008).
- RIP1'in de-ubikinasyonu TNF'nin uyardığı nekroptozda önemli bir adımdır. cIAPs'ın inhibasyonu RIP1'in azalan ubiquinasyonu aracılığıyla kompleks II oluşumu hızlanır (Bertrand, vd., 2008).

- Kompleks II, iki farklı aşağı yönlü sinyal yoluyla aktif olur, apoptoz ve nekroz (Wu, vd., 2011).

Nekrotik hücre ölüm mekanizması Şekil 1.6.'de özetlenmiştir.

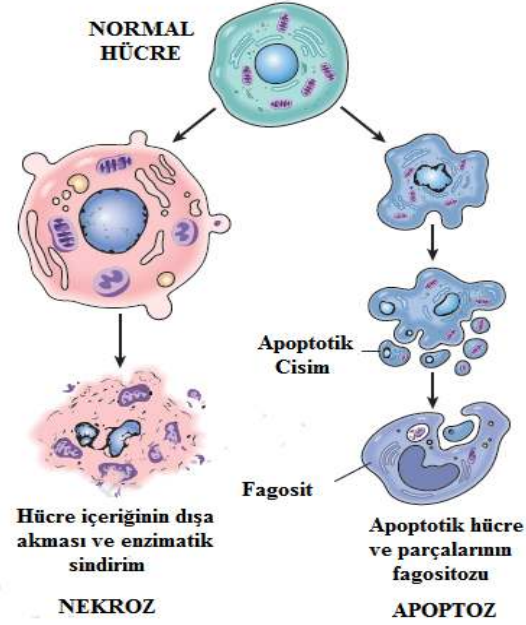


Şekil 1.6. Apoptoz ve nekroptoz sinyal yolağı arasındaki bağlantı (http://lts.yonsei.ac.kr/research/re_01.html).

1.5.4. Apoptotik ve nekrotik hücreler arasındaki temel farklar

Nekroz hücre membranının daha erken bir zamanda bozulması ile sonuçlanan, hipoksi, iskemi, aşırı sıcaklık ve mekanik travma gibi şiddetli çevresel ajanlar ile ilgili durumlarda cevap olarak oluşan pasif bir süreçtir (Kerr, J. F., vd., 1972; Wyllie, A. H., vd., 1980). Nekroz ile oluşan bazı temel morfolojik değişiklikler; hücre şişmesi, bazı sitoplazmik keselerin oluşumu, endoplazmik retikulumun şişmesi, kondanmış ya da şişmiş mitokondri, ribozomların ayrılması, hücre zarının parçalanmasıdır (Majno, G., vd., 1995; Kerr, J. F., vd., 1972). Apoptoz ise programlanmış ve enerji harcayarak hücre içi mekanizmaların aktivasyonunu içerir (Yuan, 1996). Apoptoz süreci erişkin organ ve dokuların homeostazına ilaveten embriyonik dokuların oluşumunda da rol oynar (Schittny, vd., 1998). Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişiklikler ile tanımlanır (Kerr, vd., 1972). Başlangıçta hücre bütünlüğü korunur, daha sonra büzülür, membranda cepcikler oluşur. Çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve parçalanmasını içerir. Sonraki aşamalarda, apoptotik hücreler membran bütünlüğünü kaybeder, buna “ikincil nekroz” denir (Wyllie, vd., 1980). Apoptoz ve nekroz arasındaki belirgin

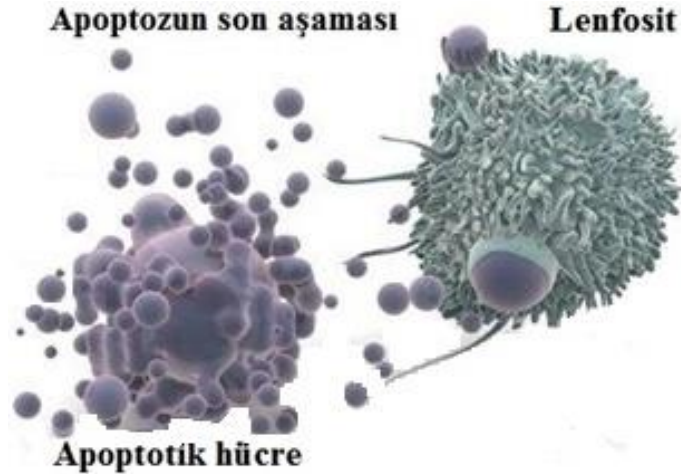
morfolojik fark Şekil 1.7’de görülmektedir. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik ve biyokimyasal farklılıkların detayları Çizelge 1.2’de özetlenmiştir. Ayrıca, geç apoptozda gözlenen apoptotik cisimcikler de Şekil 1.8’de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik fark (<http://dicionariosaude.com/necrose/>).

Çizelge 1.2. Apoptoz ve nekrozun farkları (Çoşkun ve Özgür, 2011).

	Apoptoz	Nekroz
Sebepleri	Büyüme faktörlerinin eksikliği, Hücre yaşlanması, HIV, Sitotoksik T lenfositleri Kanser ilaçları, radyasyon, Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu	İskemi, hipertermi, hipoksi, Litik viral enfeksiyon Toksik maddeler, ağır metaller, Şiddetli oksidatif stres
Morfolojik Özellikleri	Hücre zarı sağlamdır. Hücre küçülür. Cepçikler oluşur. organeller sağlamdır. Kromatin yoğunlaşması gerçekleşir. Apoptotik cisimcikler oluşur. Erken evrede fosfatidil serintranslokasyonu gözlenir.	Zar bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organeller parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. Fosfatidilserin translokasyonu yoktur.
Biyokimyasal özellikleri	Programlıdır. ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektroforezinde ladder).	İyon dengesi bozulur. ATP gerekmez. DNA rastgele parçalanır (Jel elektroforezinde smear).
Diğer özellikleri	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosit edilirler. Enflamasyon görülmez.	Hücreler gruplar halinde ölür. Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. Enflamasyona neden olur.



Şekil 1.8. Apoptozun son aşaması, apoptotik cisimcikler (Caggia, 2004).

1.6. Kaspazlar

Kaspazlar aktif bölgelerinde sistein aminoasiti içerdikleri ve substratlarını aspartik asitten sonra kestikleri için “kaspaz” olarak adlandırılmışlardır (Rastogi, vd., 2009). Bugüne kadar insanda 10, farede 4 memelilerde toplam 14 kaspaz tanımlanmıştır (Grütter, 2000). Hücre içerisinde inaktif öncül enzim olarak bulunurlar ve genellikle diğer bir kaspazın işlevi ile bazen de kendi kendilerinin oto-proteolitik katalizi ile işlev kazanırlar (Elmore, S., 2007; Lawen, A., 2003). Kaspazların hem kendilerini hem de diğer kaspazları proteolitik olarak kesmeleri, apoptotik uyarının algılanarak hızlı bir şekilde gerçekleşmesine neden olur (Rastogi, vd., 2009). Kaspazlar; başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10), efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlardır (kaspaz-1, -4, -5, -11) olmak üzere 3’e ayrılır (Elmore, 2007).

1.7. Anneksin V/FITC-PI (Propidiyum iyodür) Yöntemi ile Apoptoz Belirlenmesi

Normal hücrelerde, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunan zar lipidlerinden biri olan fosfotidilserin (PS), apoptoza girdiğinde hücre zarının dış yüzeyine taşınırlar. Bu durum apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V ise hücrenin dış yüzüne taşınan fosfotidilserin’e bağlanabilen bir proteindir. Bu protein floresan bir madde (FITC) ile işaretlenir ve apoptotik hücrelere bağlanarak görünür hale getirir (Kopman, G., vd., 1994; Overbeeke, R., vd., 1998). Anneksin V, nekrotik hücrelerin yüzeyine de bağlanabildiği için ikinci bir boya olarak vital olmayan boya olan propidium iyodür eklenmektedir (Kockx, M. M., vd., 1998; Overbeeke, R., vd., 1998).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Otoklav (Sanyo (MLS-3780)), Mikrolaka okuyucu (ELx808), CO₂ inkübatörü (Thermo Heraeus HeraCell 150), Inverted mikroskop (Olympus 1X7158F3), Steril kabin ClassII (Thermo Heraeus HS-12), Santrifüj (Biyofuge Stratos Heraeus), Manyetik karıştırıcı, Derin dondurucu, Buzdolabı, Kar-buz makinesi, Floresan mikroskop (DP72), Rotaryevaporatör, Liyofilizatör, Kuru hava sterilizatörü (Nüve FN 120), Cedex (hücre sayım ve analiz cihazı, Roche), Su banyosu (Clifton), Dijital terazi (Scaltec Spo51), Orbital çalkalayıcı tabla (GFL 3012).

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

RPMI-1640 Medyum (Sigma), Fetal bovine serum (FBS) (Sigma), Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma), Dimetilsulfoksit (DMSO) (Carlo Erba), Etilendiamintetra asetik asit (EDTA) (Sigma), Tripsin (Biochrom Consantre (10X)), Penisilin-Streptomisin (Gibco), Sodyumbikarbonat (Applichem), Metanol (Merk), N-Butanol (Merk), Hekzan (Merk), Kloroform (Merk), Etilasetat (Merk), MTT (Sigma), Akridin orange (Sigma), Etidyum bromür (Sigma), Triton X-100 (Sigma), Hidroklorik asit (HCl) (Carlo Erba), Tiripan mavisi (sigma), Nötral red (Sigma), Glasiel asetik asit (Sigma), Anneksin V/FITC apoptoz belirleme kiti (BD), Kaspaz-3, 8, 9 kolorimetrik deney kiti (Biovision), NaHCO₃ (Applichem) satın alındı, Sıvı azot Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezin'den (AÜBİBAM) temin edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan test maddesi

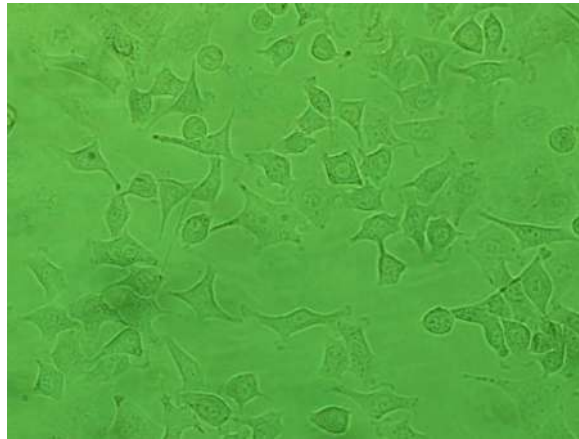
Ticari olarak satın alınan Arifoğlu® markalı öğütülmüş yeşil kahve, test maddesi olarak kullanılmıştır. Yeşil kahve ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, ana ekstre 5 farklı fraksiyona ayrılmıştır. Ana ekstre ve fraksiyonlarının her biri deneyde kullanılmak üzere Serum'suz (Fötal Sığır Serum) medyum içerisinde çözölmüş ve 50mg/ml olmak üzere ana stoklar hazırlanmıştır. Test bileşenlerinin A549 ve SPC-212 hücrelerinde uygulanan konsantrasyonları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Hücre hatlarında çalışılan yeşil kahve metanol ekstresi ve fraksiyonlarının konsantrasyonları.

Uygulanan Maddeler (mg/ml)	Metanol Ekstresi	Butanol Fraksiyonu	Etil Asetat Fraksiyonu	Sulu Fraksiyon	Demleme
A549	3	0.75	0.15	2.25	0.675
	3.25	1	0.25	2.75	1.25
	3.5	1.25	0.35	3.25	2.5
	3.75	1.5	0.45	3.75	5
	4	1.75	0.55	4.25	10
SPC-212	0.40	0.15	0.06	0.50	0.675
	0.45	0.20	0.12	0.60	1.25
	0.50	0.25	0.18	0.70	2.5
	0.55	0.30	0.24	0.80	5
	0.60	0.35	0.28	0.90	10
	0.65	0.4	0.34	1	

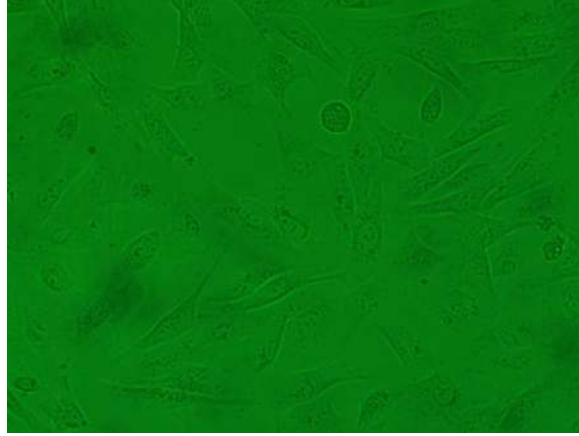
2.1.4. Kültür hücreleri

Alveolar epitel iki ana hücre tipi içerir. Bunlar alveolar tip I ve alveolar tip II'dir. Çalışmamızda kullanılan A549 küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinom, insan alveolar bazal epitel hücre hattı toksikolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan tip II pulmoner epitel hücreleri için bir modeldir (Foster, vd., 1998; Ward, H. E., vd., 1984). A549 hücre hattı adenokarinomu ilk olarak 1972'de D.J. Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşında erkek bir bireyin kanserli akciğer dokusundan kültüre edilmiştir (Giard, vd., 1973). A549 hücre hattı, Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji/Hücre Kültürü Laboratuvarında Prof. Dr. A. Tansu Koparal'ın kültür koleksiyonundan bağış olarak temin edilmiştir.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan A549 hücre hattı, büyütme: 400X.

Çalışmada kullanılan SPC-212 hücre hattı asbeste maruz kalma sonucu oluşan insan kaynaklı mezotelyoma hücre hattıdır. Hücreler heterojen fenotipe sahiptirler ve tutunarak tek tabaka halinde büyürler (Başaran, B.,2006; Gül, H., 2014). SPC-212 hücre hattı Doç. Dr. Asuman Demiroğlu Zergeroğlu (Gebze Teknoloji Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü) tarafından hediye edilmiştir.



Şekil 2.2. Çalışmada kullanılan SPC-212 hücre hattı, büyütme: 400X.

2.1.5. Deneyde kullanılan ortam içerikleri ve hazırlanışları

RPMI: A549 ve SPC-212 hücrelerinin büyütülmesinde kullanılmıştır. 5.2 g RPMI ve 0.75 g NaHCO_3 tartıldıktan sonra 445 ml steril saf su da çözülmüş ve yarım saat manyetik karıştırıcıda tamamen çözülmesi sağlandıktan sonra 0.22 μm filtre ile süzülmüştür. 50 ml FBS (Fötal Sığır Serum) ve 10000 ünite/ml Penisilin/Streptomisin'den 5 ml ilave edilerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

PBS: Sigma'dan temin edilen PBS tablet kullanılmıştır. 1 tablet 200 ml saf su içinde yarım saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüş ve otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

PBS-EDTA: Sigma'dan temin edilen PBS tablet kullanılmıştır. 200 ml saf su içine 1 PBS tablet ve 0.0372 g EDTA eklenerek yarım saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüş ve otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Tripsin-EDTA (1X): %0.5'lik 10X Tripsin-EDTA solüsyonu, PBS-EDTA solüsyonu ile 1:9 oranda karıştırılarak hazırlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

HCL (1N): 8.4 ml %37'lik HCL, steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır ve filtre ile steril edildikten sonra 4°C'de muhafaza edilmiştir.

MTT: 0.25 g MTT boyası 50 ml PBS’de çözülmüş ve 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından 0.22 µm çapında filtre ile süzülüp 2 ml’lik tüplere bölünerek -20°C’de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Nötral kırmızısı: 0,33 g tartılarak 100 ml steril distile su ile çözüldükten sonra filtre edilmiştir. 2 ml’lik tüplere bölünerek 4°C’de en fazla 3 ay süre ile karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Desorb çözeltisi: Glasiyal asetik asit, etanol ve distile su, 1:50:49 hacimde karıştırılmıştır.

Akridin oranj: 100 mg akridin oranj 1 ml distile su ile çözülmüştür. 0.22 µm çapında filtre ile süzülüp 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Etidyum bromid: 100 mg etidyum bromid 1ml distile su ile çözülmüştür. 0.22 µm çapında filtre ile süzülüp 4°C’de muhafaza edilmiştir.

%3,7’lik Formaldehit: %37’lik ana stokdan 10 ml alınmış, üzeri 90 ml PBS ile tamamlanmıştır.

2.2. Yöntem

Bu tez kapsamındaki bütün deneysel çalışmalar, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji/Hücre Kültürü Labratuvarında gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. Yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarının hazırlanma yöntemi

Ticari olarak satın alınan öğütülmüş yeşil kahvenin 50 g'ı kapaklı şişe içerisine alınır. Ekstraksiyon yöntemi polardan apolara doğru gerçekleşeceği için ana çözücü metanol olarak tercih edilmiştir. 50 g yeşil kahve üzerine 1L metanol eklenerek 24 saat bekletilmiş, sonunda madde üzerindeki metanol uzaklaştırılarak yeniden 1L metanol eklenmiştir. Bu işleme çözücü berraklaşana kadar oda sıcaklığında ve manyetik karıştırıcıda tekrarlanmıştır. Bu sürecin sonunda, metanol rotary evaporatörde 60°C'de uçurulmuştur. Dipte kalan çökelti -86 °C'de 2 gün dondurulduktan sonra liyofilizatörde tamamen liyofilize edilmiştir.

1. Hekzan fraksiyonu: Ana ekstre olarak, liyofilizasyon sonunda toplam 13,90 g metanol ekstresi elde edilmiştir. 10 g metanol ekstresi üzerine 250 ml distile su ilave edilip çözülmüş ve 500 ml'lik ayırma hunisine aktarılarak üzerine 1:1 oranında (250 ml) hekzan eklenmiştir. Ayırma hunisinde çalkalanıp birkaç dakika beklendikten sonra, hekzan fazı sulu fazdan ayrılmış ve başka bir şişeye aktarılmıştır. Bu işleme hekzanın rengi berraklaşmaya kadar devam edilmiş ve tüm hekzan fazı bir şişede toplanmıştır. Hekzan fazı berraklaştığında hekzan çözücüsüne geçecek bileşen kalmadığı düşünülerek ekstraksiyon sonlandırılmıştır.

2. Kloroform fraksiyonu: 250 ml kloroform, hekzan fazından arta kalan sulu faz ile ayırma hunisinde birleştirilerek, çalkalanıp birkaç dakika beklenmiştir. Hekzan ekstresinin hazırlanışındaki aynı işlemler kloroform için uygulanmıştır. Kloroform fazı da bir şişede toplanmıştır.

3. Etil asetat fraksiyonu: 250 ml etil asetat, kloroform fazından arta kalan sulu faz ile ayırma hunisinde birleştirilerek, çalkalanıp birkaç dakika beklenmiştir. Hekzan ekstresinin hazırlanışındaki aynı işlemler etil asetat için uygulanmıştır. Etil asetat fazı da bir şişede toplanmıştır.

4. N-Butanol fraksiyonu: 250 ml n-Butanol, etil asetat fazından arta kalan sulu faz ile ayırma hunisinde birleştirilerek, çalkalanıp birkaç dakika beklenmiştir. Hekzan

ekstresinin hazırlanışındaki aynı işlemler n-butanol için uygulanmıştır. n-butanol fazı da bir şişede toplanmıştır.

5. Sulu fraksiyonu: n-butanol fazı bir şişede tolandıktan sonra ayırıcı hunide kalan kısım sulu fazdır. Bu sulu faz ayrıca bir şişeye alınmıştır.

6. Demleme: 2 g toz yeşil kahve tartılır üzerine 100 ml kaynamış su ilave edilmiş, 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,22 µm filtreden süzülerek ana stok elde edilmiştir.

Elde edilen fraksiyonların her birinin çözücülere, farklı zamanlarda evaporatörde uçurulmuştur. Uçurma işleminden sonra kalan kısım bir tüpe aktarılmış 2 gün boyunca -86°C’de bekletilmiştir ve sonrasında liyofilize edilmişlerdir. Ekstraksiyon işlemi Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Anabilim Dalı’nda Sayın Tuncay AGAR’ın yüksek lisans tezi ve Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümünden sayın Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU’nun bilimsel araştırma projesi referans alınarak (Ağar, O. T., 2010; Velioğlu, S., 2007), Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Labratuarında modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan tüm test bileşenleri ve dozları, serumsuz kültür mediumunda dilüsyonları yapılarak hazırlanmıştır. Ancak, hekzan ve kloroform fraksiyonları mediumda çözünmediği için çalışmada kullanılmamıştır. Bu fraksiyonların biyolojik aktiviteleri daha sonraki çalışmalarda araştırılacaktır.

2.2.1.1. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması

Liyofilize edilen ekstrelerin verimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\% \text{ verim} = (W1 \times 100) / W2$$

W1: Liyofilizasyondan sonra elde edilen madde ağırlığı

W2: Ekstraksiyon için kullanılan madde ağırlığı (Velioğlu, 2007).

2.2.2. Hücrelerin büyütülmesi

Küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinomu A549 (insan alveolar bazal epitel hücreleri) ve insan kaynaklı mezoteloma hücreleri (SPC-212), %10 FBS (Fötal sıgır serumu), 100 ünite/ml penisilin/streptomisin, 1500 mg/L NaHCO₃ ve 2mM L-glutamin içeren RPMI medyum içerisinde, %5 CO₂ bulunduran inkübatörde 37°C’de kültüre edilmiştir. Hücreler 25 cm² ve 75 cm² flasklarda büyütülmüş ve uygun yoğunluğa eriştiğinde, 1XTripsin/EDTA (10X) ile kaldırılarak pasajlanmıştır.

2.2.3. Sitotoksik etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

İlk olarak Mossman (Mossman, 1983) tarafından geliştirilmiş MTT yöntemi, canlı hücreler üzerinde çeşitli bileşenlerin sitotoksik etkilerini belirlemek için son zamanlarda sık kullanılan bir yöntemdir. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) reaktifinin tetrazolyum halkası mitokondiride bulunan süksinatdehidrogenaz enzimi tarafından parçalanarak suda çözünemeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşmekte, oluşan formazan kristalleri hücre membranından geçemedikleri için sağlıklı hücrelerde birikmektedir (Oktar, N., 2009; Terzioğlu, G., vd., 2013; Fotakis, G., vd., 2006; Yaka, E., vd., 2006).

A549 ve SPC-212 hücreleri sırasıyla 5×10^3 ve $6,5 \times 10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu kültür plakalarına ekilip 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, eski medyum uzaklaştırılmış ve kuyulara, Çizelge 2.1’de belirtilen dilüsyonlarda test bileşeni içeren taze medyumdan 150 µl dağıtılarak 24, 48 ve 72 saat sürelerde kültür koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kuyulardaki medyum 5 mg/ml MTT içeren medyum ile değiştirilmiş ve 2 saat daha inkübe edilmiştir. Ardından, medyum atılmış ve canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözünmesi için her kuyuya DMSO (100 µl) eklenerek 15 dakika ışısız ortamda çalkalayıcı tablada (GFL-3012) bekletilmiştir. Oluşan renk şiddeti 570 nm dalga boyunda ELISA (ELx808-IU) cihazında ölçülmüştür.

2.2.4. Sitotoksik etkinin Nötral kırmızısı (NK) yöntemi ile belirlenmesi

Nötral kırmızısı (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) (NK) boyası, canlı hücreleri belirlemede kullanılmaktadır. Nötral kırmızısı supravital (organizmadan çıkarılan hücre ve dokuları öldürmeyen) boyadır. 1984’de Borenfreund ve Puerner (Borenfreund ve Puerner, 1985, 1986) tarafından canlı ve hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında biriktiği tespit edilmiş ve nötral kırmızısı boyama protokolü oluşturulmuştur (Fotakis, G., vd., 2006; Weyermann, J., vd, 2005).

Nötral kırmızısı testi, Borenfreund ve Puerner’in yöntemi temel alınarak uygulanmıştır. A549 ve SPC-212 hücreleri sırasıyla 5×10^3 ve $6,5 \times 10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu kültür plakalarına ekilip 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından, eski medyum uzaklaştırılmış ve kuyulara, Çizelge 2.1’de belirtilen dilüsyonlarda test bileşeni içeren taze medyumdan 150 µl dağıtılarak 24, 48 ve 72 saat sürelerde kültür koşullarında büyütülmüşlerdir. NK boyasının ana stoğu hazırlanmış, kültür

mediumunda %1 oranında seyreltilerek yarım saat 37⁰C’lik inkübatörde bekletilmiştir. Test bileşenleriyle inkübe edilmiş hücrelerin medyumları atılarak her kuyu 100 µl PBSA ile yıkanmıştır. Ardından, kuyulara 250 µl aktive edilmiş %1 NK/medyum eklenmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonunda, her bir kuyu 100 µl PBS-A ile tekrar yıkanmıştır. PBSA uzaklaştırılarak her bir kuyuya 100 µl DESORB eklenmiş ve 15 dakika ışiksiz ortamda 30 rpm’de çalkalayıcı tablada (GFL-3012) çalkalanmıştır. Oluşan renk şiddeti 540 nm dalga boyunda ELISA (ELx808-IU) cihazında ölçülmüştür.

2.2.5. Apoptozun hücrelerdeki morfolojik incelenmesi

2.2.5.1. Akridin Oranj/Etidyum Bromid (AO/EB) çift boyama

Test bileşenlerinin apoptotik hücre ölümündeki rolü, hücre membranı ve nükleusdaki değişikliklerin incelenmesi için hücreler AO/EB ile çift boyanmıştır. Akridin oranj hem canlı hem de ölü hücreleri boyamakta, Etidyum Bromür ise zar bütünlüğünü kaybetmiş, ölü hücreleri boyamaktadır. Canlı hücreler ve apoptozun erken dönemindeki hücreler yeşil renkte gözlenmektedir. Özellikle apoptozun erken döneminde, çekirdekte görülen yoğunlaşma ve kromatin fragmentasyondan dolayı bu kısımlarda daha koyu parlak yeşil renkli noktalar görülür. Geç apoptotik dönemdeki hücreler, Etidyum Bromür ile turuncu/kırmızı renge boyanmaktadır. Bunun dışında, membran yapısı bozulan nekrotik hücreler de Etidyum Bromür ile boyanmakta ve turuncu/kırmızı renkte görülmektedir (Gürbüz, V., vd., 2011; Ribble, D., vd., 2005; Avcı, Ç. B., vd., 2013).

AO/EB çift boyama için Arrifin ve arkadaşlarının (Arrifin, 2009) kullandığı yöntem geliştirilerek uygulanmıştır. A549ve SPC-212 hücreleri sırası ile 1,5x10⁵ ve 2x10⁵ hücre/kuyu şeklinde 6 kuyulu plakalara ekilmiş 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, yeşil kahve ekstre ve fraksiyonları Çizelge 2.2’de belirtilen dozlarda uygulanmış ve 48 saat inkübe edilmiştir. Ardından, her kuyudaki hücreler 1X Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 1ml medyum içerisinde toplanmış ve 5 dakika 1250 x rpm de santrifüj edilmiş ve pellet, 25 µl medyum ile yeniden süspanse edilmiştir. 25 µl hücre üzerine 5 µg/µl konsantrasyonda AO ve EB solüsyonundan 1µl eklenerek hücreler boyanmış ve preparat oluşturulmuştur. Preparatların lamelleri tırnak cılası ile kapatılarak karanlık ve soğuk ortanda tutularak floresan olarak incelenmiştir. Her bir preparat floresan mikroskopta (Olympos BX50), FITC (WB) filtrede incelenip

fotoğraflanmıştır. Bu preparatların her birinden tesadüfî seçilmiş en az 10 alan incelenmiş ve toplam en az 500 hücre sayılarak apoptotik hücre oranı belirlenmiştir.

Apoptotik hücre yüzdesi aşağıdaki formülle belirlenmektedir (Duke, 2004).

$$\text{Apoptotik indeks (\%)} = (LA+DA)/(LN+LA+DN+DA) \times 100$$

$$\text{Nekrotik indeks (\%)} = DN / (LN+LA+DN+DA) \times 100$$

$$\text{Ölü hücre (\%)} = (DN+DA) / (LN+LA+DN+DA) \times 100$$

LN: Normal çekirdeğe sahip parlak yeşil canlı hücre

LA: Apoptotik çekirdeğe sahip parlak yeşil canlı hücre

DN: Normal çekirdeğe sahip parlak kırmızı veya turuncu ölü hücre

DA: Apoptotik çekirdeğe sahip parlak kırmızı veya turuncu ölü hücre

Çizelge 2.2. Hücre hatları üzerinde morfolojik etkinin çalışıldığı yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarının konsantrasyonları.

Uygulanan Maddeler (mg/ml)	Metanol Ekstresi	Butanol Fraksiyonu	Etil Asetat Fraksiyonu	Sulu Fraksiyon	Demleme
A549	2.75	0.75	0.35	2.25	5
	3	1	0.45	2.75	10
	3.25	1.25	0.55	3.25	15
SPC-212	0.55	0.25	0.24	0.70	2.5
	0.60	0.30	0.28	0.80	5
	0.65	0.35	0.34	0.90	10

2.2.6. Kaspaz-8, -9, -3 enzim aktivasyonunun belirlenmesi

A549 ve SPC-212 hücre hatlarında madde maruziyeti sonrasında kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3 enzim seviyelerini belirlemek için Biovision kaspaz-3, -8, -9 kolorimetrik kiti kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışma kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. A549 ve SPC-212 hücreleri sırası ile $1,5 \times 10^6$ ve 2×10^6 hücre/flask şeklinde 75'lik flasklara ekilmiştir. 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında yeşil kahveden elde ettiğimiz ekstre ve fraksiyonlar Çizelge 2.3'de belirtilen dozlarda uygulanmıştır. Bu uygulama sonrasında 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, her kuyudaki hücreler 1X Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 5 ml medyum

içerisinde toplanmış ve 5 dakika 1250 x rpm de santrifüj edilmiş ve pellet elde edilmiştir. Her bir pellet üzerine 50 µl hücre liziz tamponu ilave edilerek hücreler süspanse hale getirilip buzun içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Beklemenin ardından 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant buz içerisinde bekletilen temiz tüplere aktarılıp, protein konsantrasyonu Nanodrop® cihazı ile ölçülmüştür. Mikroplaka okuyucu (ELx808-IU)'da ölçüm yapabilmek için 96 kuyulu plakalar kullanılmıştır. Kuyu başına her bir deney için 100-200 µg proteine 50 µl hücre liziz tamponu eklenmiştir. Ardından, 10 mM DTT içeren 2X Reaksiyon Tamponundan 50 µl ve 4 mM IETD-pNA kaspaz-8 substratından 5 µl eklenerek 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi tamamlandığında kaspaz enzim aktiviteleri 405 nm dalga boyunda ELISA (ELx808-IU) cihazında ölçülmüştür. Aynı işlemler kaspaz-9 ve -3 için de gerçekleştirilmiştir. Fakat kaspaz-9 ve -3 için sırası ile LEHD-pNA, DEVD-pNA substratları kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. A549 ve SPC-212 hücre hatlarında kaspaz -3, 8, 9 enzim aktivitelerini belirlemek için yeşil kahve ekstralarının uygulanan konsantrasyonları.

Uygulanan Maddeler (mg/ml)	Metanol Ekstresi	Butanol Fraksiyonu	Etil Asetat Fraksiyonu	Sulu Fraksiyonu	Demleme
A549	2.75	0.75	0.35	2.25	5
SPC-212	0.55	0.25	0.24	0.70	2.5

2.2.7. Anneksin V/FITC -PI boyama yöntemi ile apoptoz analizi

A549 ve SPC-212 hücre hatlarında madde maruziyeti sonrasında hücre zarındaki değişimi belirlemek için BD markalı Anneksin V/FITC Apoptoz Belirleme Kit I kullanılmıştır. Yapılan çalışma üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. A549 ve SPC-212 hücreleri sırası ile $1,5 \times 10^5$ ve 2×10^5 hücre/kuyu şeklinde 6 kuyulu plakalara ekilmiş 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, yeşil kahve ekstre ve fraksiyonları Çizelge 2.4'de belirtilen dozlarda uygulanmış ve 48 saat inkübe edilmiştir. Ardından, her kuyudaki hücreler 1X Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 1ml medyum içerisinde toplanmış ve 5 dakika 1250 x rpm de santrifüj edilmiş ve medium pellet üzerinden uzaklaştırılmıştır. Ardından 2 defa 2 ml soğuk PBS ile yıkanmıştır. 10X Bağlanma Tamponu su ile 1X'e seyreltilerek 100

μ l pellet üzerine eklenmiştir. Karanlık ortamda temiz bir tüp içerisine 5 μ l Anneksin V/FITC ve 5 μ l PI (Propidyum İyodür) eklenmiştir. 1X Bağlanma Tamponu ile muamele edilen hücrelerden 100 μ l alınarak 5 μ l Anneksin V/FITC ve 5 μ l PI boyalarının bulunduğu tüpe aktarılmıştır. 15 dakika oda ısısında ve karanlıkta bekledikten sonra üzerine 1X Bağlanma Tamponundan 400 μ l eklenerek her tüpün 500 μ l son hacime ulaşması sağlanarak karanlıkta 15 dakika muhafaza edilmiştir. FITC'nin verdiği floresan ışına akım sitometri cihazında (BD FACS Aria) analiz edilmiştir.

Çizelge 2.4. A549 ve SPC-212 hücre hatlarında anneksin V/FITC yöntemi için uygulanan dozlar.

Uygulanan Maddeler (mg/ml)	Metanol Ekstresi	Butanol Fraksiyonu	Etil Asetat Fraksiyonu	Sulu Fraksiyon	Demleme
A549	3	1	0.45	2.75	10
SPC-212	0.60	0.30	0.28	0.80	5

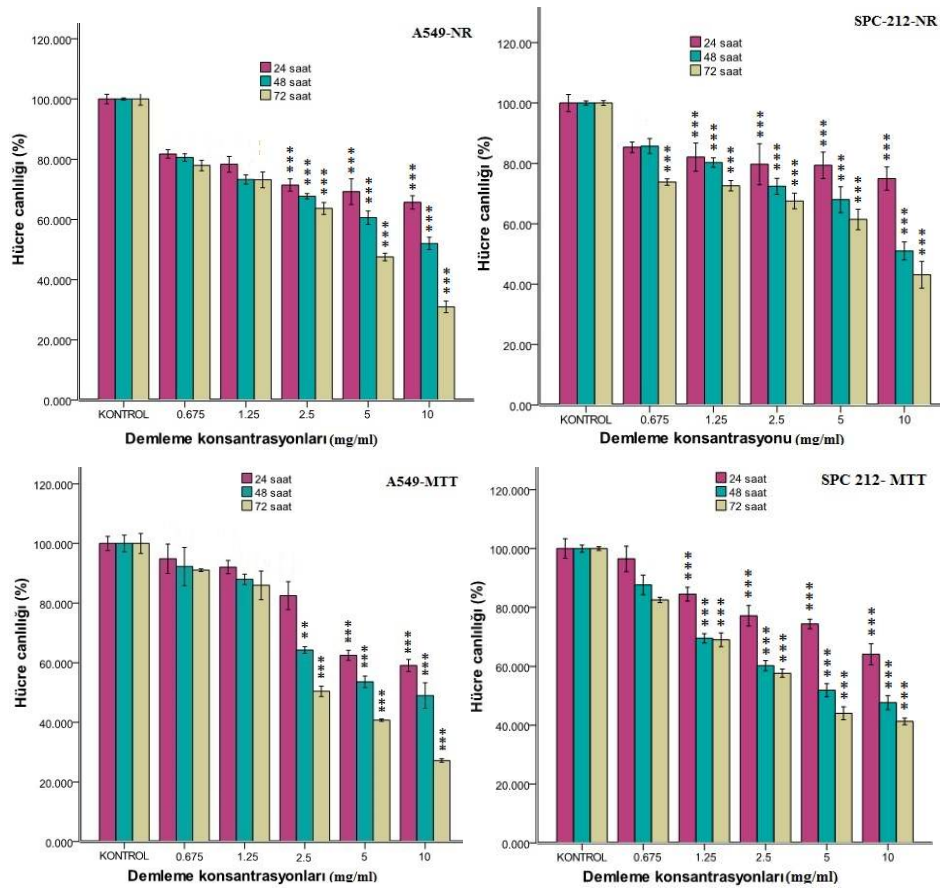
2.2.8. İstatistiksel analiz

SPSS Statistics 17.0 programı ile MTT, NR ve Kaspaz-8, -9, -3 yöntemlerinden elde edilen veriler analiz edilmiştir. SPSS Statistics 17.0 programında Compare Means/One-way ANOVA analizinde Post-Hoc testlerinden Tukey, Scheffe ve Thamhene's T2 testleri uygulanmıştır. Varyans eşleşliği şartı Test of Homogeneity of Varians testi ile belirlenmiştir. Verilerin anlamlılık değerleri $p > 0.05$ ise Tukey, $p < 0.05$ ise Thamhane's T2 testinin sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. ANOVA testi ile belirlenen tüm istatistiksel analizler $p < 0.05$ yani %95 güvenle grupların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır.

3. BULGULAR

3.1. Demlenmiş Yeşil Kahvenin Sitotoksik Aktiviteleri (Ön Çalışma)

Öğütülmüş demlenmiş yeşil kahvenin hücrelerdeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, Nötral Red (NR) ve MTT testleri uygulanmıştır. Her bir deney en az 3 kez tekrarlanmıştır. NR testi sonuçlarına bakıldığında; her iki hücre hattında da hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma gözlenmiştir. 24 saatte hücre canlılığı %50'nin üzerinde tespit edilmiştir. 48 saatte ise 10 mg/ml dozu her iki hücrede de yaklaşık IC_{50} değeri olarak görülmüştür. 72 saatte, A549 hücrelerinde IC_{50} değeri yaklaşık 2.5-5 mg/ml arasında tespit edilirken, SPC-212 hücrelerinde bu değer 5-10 mg/ml arasındadır.



Şekil 3.1. Demlenmiş yeşil kahvenin sitotoksik aktiviteleri (*: Kontrole göre anlamlı fark; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

NR testine oranla, MTT testi daha hassas sonuç vermiştir. Her iki hücre hattında da hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma gözlenmiştir. 24 saatte hücre canlılığı bütün hücrelerde ve dozlarda %50'nin üzerinde olmakla birlikte, 48 saatte

A549 için 5 mg/ml ve SPC-212 hücrelerinde en yüksek doz olan 10 mg/ml IC₅₀ değeri olarak tespit edilmiştir. 72 saatte ise A549 hücrelerinin IC₅₀ değeri yaklaşık 2.5 mg/ml ölçülürken SPC-212 hücrelerinde yaklaşık 5 mg/ml ölçülmüştür. A549 MTT deneyinde elde edilen 24 saat verileri Tukey, 48 ve 72 saat verileri Thamhane's T2 testine göre, A549 NR deney sonuçları ise Tukey testine göre analiz edilmiştir. SPC-212 MTT ve SPC-212 NR deneyinde elde edilen veriler Tukey, testine göre analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.1'de verilmiştir.

3.2. Yeşil Kahve Metanol Ekstresi ve Diğer Fraksiyonlarda Verim Hesabı

Liyofilizasyon işleminden sonra ekstrenin ve fraksiyonların verimi aşağıdaki formülegöre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Verim} = (W1 \times 100) / W2$$

Formülde W1 ifadesi, çözücünün liyofilizasyonla uzaklaştırılmasından sonraki kuru ağırlığı, W2 ise yeşil kahvenin kuru ağırlığını gösterir. Her bir çözücü ile hazırlanan fraksiyonların verim (%) oranları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Metanol ekstresi ve diğer fraksiyonların kuru ağırlık ve % verimleri.

Çözücüler	Metanol	Hekzan	Kloroform	N-Butanol	Sulu faz	Etil Asetat
Başlangıç Maddesi (g)	50	10	10	10	10	10
Kuru ağırlık (g)	13.92	3.16	1.09	2.61	2.03	2.61
Verim (%)	27.84	31.6	10.9	26.1	20.3	10.3

Çalışmada kullanılan tüm test bileşenleri ve dozları, serumsuz kültür mediumunda dilüsyonları yapılarak hazırlanmıştır. Ancak, hekzan ve kloroform fraksiyonları mediumda çözünmediği için çalışmada kullanılmamıştır. Bu fraksiyonların biyolojik aktiviteleri daha sonraki çalışmalarda araştırılacaktır.

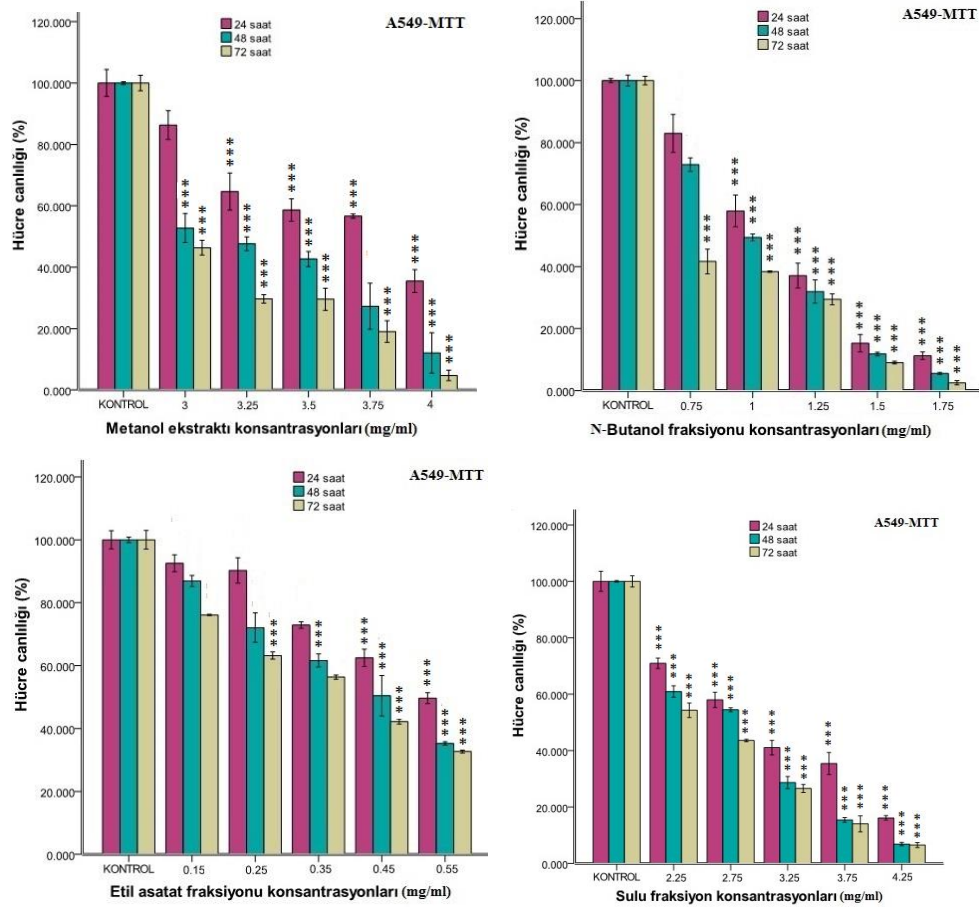
3.3. Yeşil Kahve Ekstre ve Fraksiyonların Sitotoksik Aktiviteleri

3.3.1. A549 hücrelerindeki sitotoksik aktiviteler

Metanol ekstresi

Çizelge 2.1'de belirtilen dozlarda metanol ekstresinin A549 hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi uygulanarak, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. 24 ve 72 saatte elde edilen veriler Tukey testi, 48 saatte elde edilen veriler Thamhane's T2 testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma gözlenmiştir. En düşük doz 3 mg/ml ve en yüksek 4 mg/ml'de hücre canlılıkları incelendiğinde; 24 saatte

canlılık sırasıyla, %86'dan %35'e düşerken IC_{50} değeri 3.75 ile 4 mg/ml arasında bulunmuştur. 48 saatte hücre canlılığı %52'den %13'e düşmüş ve IC_{50} değeri 3 mg/ml olarak tespit edilmiştir. 72 saatte ise canlılığın %46'dan %4'e düştüğü gözlenmiş ve denenen bütün dozlarda hücre canlılığı %50'den az olduğu için IC_{50} değeri belirlenememiş ve yaklaşık olarak 4 mg/ml dozu IC_{50} değeri olarak kabul edilmiştir. Metanol ekstresi, fraksiyonlara oranla A549 hücrelerinde zayıf bir sitotoksik aktivite sergilemiştir.



Şekil 3.2. A549 hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik aktiviteler (*: Kontrole göre anlamlı fark; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

N-Butanol fraksiyonu

Butanol fraksiyonunun A549 hücre canlılığı üzerine etkisi MTT yöntemi ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür. 24 saatlik ölçümler Tukey, 48 ve 72 saatlik ölçümler Thamhane's T2 testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma gözlenmiştir. 24 saat inkübasyon

sonucunda en düşük dozda (0.75 mg/ml) canlılık oranı %82, en yüksek dozda (1.75 mg/ml) ise %11 gözlenirken IC_{50} değeri, 1-1.25 mg/ml arasında görülmüştür. 48 saat sonunda canlılık oranı, en düşük dozda (0,75 mg/ml) %72 ve en yüksek dozda (1.75 mg/ml) ise %5'dir. IC_{50} değeri ise 1 mg/ml'dir. 72 saatte hücre canlılığı en düşük dozda (0.75 mg/ml) % 41 iken en yüksek dozda (1.75 mg/ml) %2'ye düşmüştür. 72 saatte uygulanan tüm dozlarda hücre canlılığı %50'nin altında görülmüştür ve bu sebeple IC_{50} değeri tespit edilememiştir. N-Butanol fraksiyonun A549 hücresinde yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Diğer fraksiyonlar ve metanol ekstresi arasında oldukça düşük dozlarda, düşük hücre canlılığı görülmüştür.

Etil asetat fraksiyonu

Etil asetat fraksiyonunun A549 hücre canlılığı üzerine etkisi MTT yöntemi ile 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. 24 ve 48 saat sonunda elde edilen veriler Tukey, 72 saat sonunda elde edilen veriler Thamhane's T2 testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma gözlenmiştir. 24 saat dozlarındaki hücre canlılık oranı %92-49 arasında değişmektedir ve IC_{50} değerinin 0.55 mg/ml'den daha yüksek olduğu görülmüştür. 48 saatte dozların hücre canlılığına olan etkisi %86-35 arasında değişmektedir ve IC_{50} değeri 0.45 mg/ml olarak ölçülmüştür. 72 saat sonunda ise 0.150 mg/ml uygulanan dozdan itibaren hücre canlılık oranının düştüğü görülmeye başlanmıştır ve dozların hücre canlılığı üzerine olan etkisi %76-32 arasında değişmektedir. IC_{50} değeri 0.45 mg/ml bulunmuştur. Etil asetat fraksiyonu A549 hücreleri üzerinde en yüksek sitotoksik aktiviteye sahiptir.

Sulu fraksiyon

Su ile hazırlanan fraksiyonun A549 hücre hattı üzerine sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi ile, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kolorimetrik olarak ölçülmüştür ve tüm ölçümler Tukey testi ile analiz edilerek sonuçlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma gözlenmiştir. 24 saat sonunda, en düşük dozda (2.25 mg/ml) canlılık oranı % 70 iken en yüksek dozda (4.25 mg/ml) %16'dır. IC_{50} değeri 2.75-3.25 mg/ml belirlenmiştir. 48 saatte, canlılık %60 ve 6 arasında değişirken, IC_{50} değeri ise 2.75 mg/ml arasındadır. 72 saat sonunda ise canlılık oranı % 54-6 arasında gözlenmiştir. IC_{50} değeri 2.25 mg/ml olarak belirlenmiştir.

3.3.2. SPC-212 hücrelerindeki sitotoksik aktiviteler

Metanol ekstresi

Çizelge 2.1’de belirtilen dozlarda metanol ekstresinin SPC-212 hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi, MTT yöntemi uygulanarak, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. 24 ve 72 saatlik veriler Tukey, 48 saatlik veriler Thamhane’s T2 testi ile analiz edilerek sonuçlar Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Bütün fraksiyonlarda hücre canlılığı doza ve zamana bağlı olarak azalma göstermiştir. 24 saat sonunda, hücre canlılık oranı % 86-52 arasında değişmiştir ve IC_{50} değeri 0.65 mg/ml olarak bulunmuştur. 48 saatte, canlılık en düşük dozda % 85 iken en yüksek dozda % 39’dur, IC_{50} değeri ise yaklaşık 0.6 mg/ml’dir. 72 saatte ise canlılık %79 ile %38 arasındadır. IC_{50} değeri de 0.55-0.6 mg/ml arasında belirlenmiştir.

N-Butanol fraksiyonu

N-Butanol fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi, MTT yöntemi uygulanarak, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. 24 saatte elde edilen veriler Thamhane’s T2, 48 ve 72 saatlik veriler Tukey testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Bütün fraksiyonlarda hücre canlılığı doza ve zamana bağlı olarak azalma göstermiştir. 24 saat inkübasyon sonunda hücre canlılık oranı en düşük doz (0.15 mg/ml)’da %88 olarak gözlenirken en yüksek doz (0.4 mg/ml)’da ise canlılık % 18’e düşmüştür. IC_{50} değeri yaklaşık 0.35-0.3 mg/ml’dir. 48 saatin canlılık oranı %90 ile %9 arasında değişmektedir ve IC_{50} değeri yine 0.3 mg/ml’dir. 72 saatte canlılık oranı % 78 ile %6 arasındadır. IC_{50} değeri ise 0.25-0.3 mg/ml aralığında tespit edilmiştir.

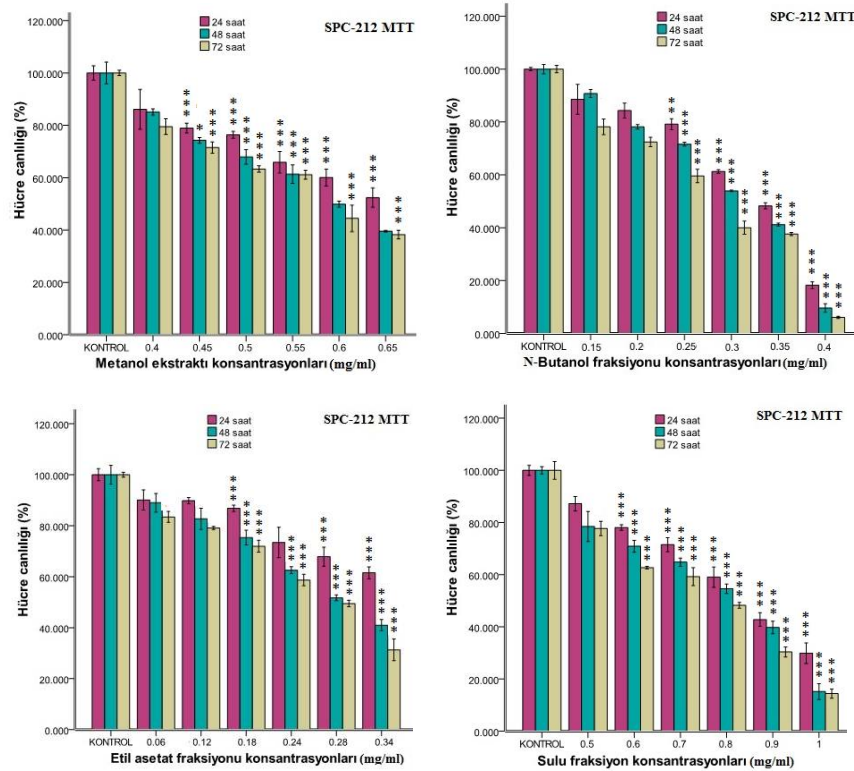
Etil asetat fraksiyonu

Etil asetat fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi, MTT yöntemi uygulanarak, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. 24 saatte elde edilen veriler Thamhane’s T2, 48 ve 72 saatlik veriler Tukey testi ile analiz edilerek sonuçlar Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Bütün fraksiyonlarda hücre canlılığı doza ve zamana bağlı olarak azalma göstermiştir. 24 saat sonunda maddenin en düşük dozu olan 0.06 mg/ml’de canlılık oranı %90 iken en yüksek 0.34 mg/ml’de canlılık %61’e düşmüştür. Hücre canlılık oranı %50’nin altına düşmediği için IC_{50} değeri belirlenememiştir. 48 saat sonunda canlılık oranları % 88 ile %40 arasında, 72 saat sonunda canlılık oranları % 83 ile % 31 arasında değişmektedir. IC_{50} değerleri, hem 48

hem de 72 saatte 0.28 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Sulu fraksiyon

Sulu fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi, MTT yöntemi uygulanarak, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. 24 ve 72 saatlik ölçümler Tukey, 48 saatlik ölçümler Thamhane's T2 testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Bütün fraksiyonlarda hücre canlılığı doza ve zamana bağlı olarak azalma göstermiştir. 24 saatte, 0.5mg/ml'de canlılık %87 iken 1 mg/ml'de % 29'a düşmüştür. IC₅₀ değeri, 0.8-0.9 mg/ml arasındadır. 48 saatte canlılık, %78-15 arasında ve IC₅₀ ise 0.8 mg/ml'dir. 72 saatteki hücre canlılığı, %77 ile %14 arasındadır ve IC₅₀ değeri ise 0.7-0.8 mg/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 3.3. SPC-212 hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik aktiviteler (*: Kontrole göre anlamlı fark; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

Akciğer kanseri (A549) ve mezotelioma (SPC-212) hücreleri birbiriyle kıyaslandığında, mezotelioma hücrelerinin yeşil kahvenin bütün ekstre ve fraksiyonlarına karşı çok daha yüksek hassasiyete sahip olduğu görülmüştür. Akciğer kanseri hücrelerindeki dozlardan yaklaşık 10 katı daha düşük dozlarda oldukça yüksek sitotoksikiteye rastlanmıştır.

3.4. Apoptotik Aktivitenin Morfolojik İncelenmesi

3.4.1. AO/EB çift boyama yöntemi

Yeşil kahvenin metanol ekstresinin ve fraksiyonlarının farklı konsantrasyonları ile muamele edilen A549 ve SPC-212 hücrelerindeki apoptotik aktivite, Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) çift boyama yöntemiyle morfolojik olarak floresan mikroskopta FITC filter ile incelenmiştir.

Apoptotik, nekrotik ve ölü hücre indeksleri

Duke (2004)'un geliştirdiği yönteme göre; AO/EB ile boyandığında, normal çekirdeğe sahip ve yeşil renkte görünen hücreler canlıdır (LN: Live cell, Normal nuklei). Yoğun ve parçalı kromatine sahip, parlak yeşil hücreler erken apoptotik evrededir (LA: Live Cell, apoptotic nuclei). Parlak kırmızı olan ve normal çekirdeğe sahip olan hücreler ise ölü hücrelerdir (DN: Dead cell, Normal nuclei). Yoğun ve parçalı kromatine sahip, parlak kırmızı renkte olan hücreler ise geç apoptotik hücrelerdir (DA: Deal cell, Apoptotic nuclei). 500-1500 arasında hücre sayılmış ve aşağıdaki formül kullanılarak apoptotik indeks, nekrotik indeks ve ölü hücre indeksleri hesaplanmış ve %'de grafikleri Şekil 3.4'de sunulmuştur. Sonuçlar iki bağımsız deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

$$\text{Apoptotik indeks (\%)} = (LA+DA)/(LN+LA+DN+DA) \times 100$$

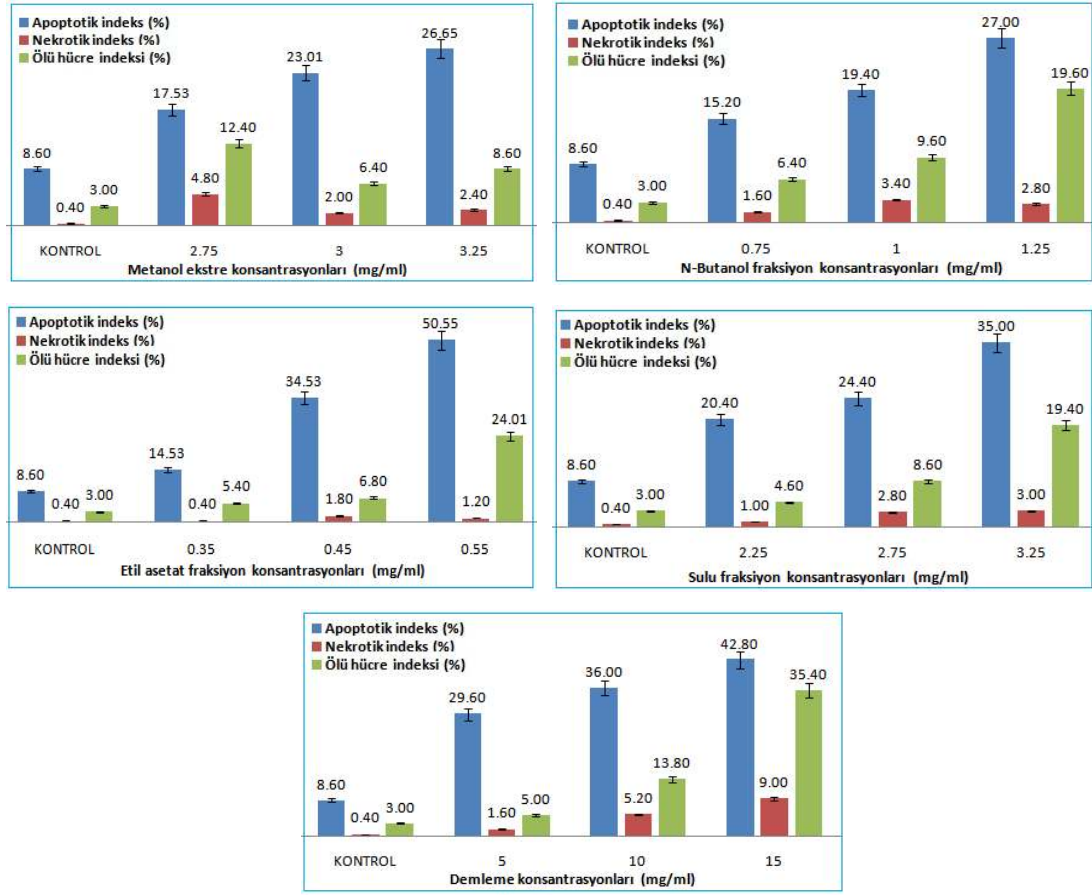
$$\text{Nekrotik indeks (\%)} = DN / (LN+LA+DN+DA) \times 100$$

$$\text{Ölü hücre (\%)} = (DN+DA) / (LN+LA+DN+DA) \times 100$$

A549 hücreleri

A549 hücrelerinin kontrol grubunda, apoptotik indeks, %8.6 iken nekrotik indeks %0.4 ve ölü hücre oranı ise %3 olarak hesaplanmıştır. Yeşil kahvenin ekstre ve fraksiyonları ile demlenmiş yeşil kahve uygulanan akciğer kanseri hücrelerinde, apoptoz, nekroz ve hücre ölüm indekslerinde doza bağlı 2-6 kat artış görülmüştür.

Metanol ekstresi uygulanan her üç doz (2.75, 3, 3.25 mg/ml)'da apoptotik indeks, sırasıyla; % 17.53, 23.01 ve 26.65, olarak hesaplanmıştır. Nekrotik indeks; en düşük doz 2.75 mg/ml'de % 4.8'e yükselmiştir. Ancak, diğer dozlarda apoptotik indeks doza bağlı artarken nekrotik indeks %2-2.5 seviyesinde görülmüştür. Ölü hücre oranı (geç apoptoz ya da geç nekroz) ise en düşük dozda ölü hücre oranı yaklaşık %12 civarında bulunmuş, diğer dozlarda ise %6.5-8.5 civarında görülmüştür.



Şekil 3.4. Yeşil kahve metanol ekstresi ve fraksiyonlarının A549 hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve ölü hücre indeksleri.

N-Bütanol fraksiyonu uygulandığında, doza bağlı olarak orantılı bir artış gözlenmiştir. Butanol fraksiyonu uygulanan her üç doz (0.75, 1, 1.25 mg/ml)'da apoptotik indeks, sırasıyla; % 15.20, 19.40 ve 27.00 olarak hesaplanmıştır. Nekrotik indeks ise sırasıyla, % 1.6, 3.4 ve 2.8 dir. Diğer yandan; ölü hücre indeksi, doza bağlı olarak % 6.4'dan 19.6'ya yükselmiştir.

Etil asetat fraksiyonu uygulanan her üç doz (0.35, 0.45, 0.55 mg/ml)'da apoptotik indeks, sırasıyla; %14.53, 34.53 ve 50.55 olarak hesaplanmıştır. Nekrotik indeks, doza bağlı olarak, %0.4'dan %1.8'e çıkmıştır ve kontrole göre (%0.4), anlamlı bir artıştır. Ölü hücre indeksi ise yüksek dozda %24'e yükselmiştir. Etil asetat fraksiyonu, A549 hücrelerinde 0.55 mg/ml gibi diğerlerine göre oldukça düşük konsantrasyonda uygulandığında, son derece anlamlı bir apoptotik indek ve ölü hücre indeksi sergilemiştir. Diğer fraksiyonlarla kıyaslandığında, oldukça güçlü bir apoptotik indeks belirlenmiştir. Uygulanan en yüksek dozu 0.55 mg/ml de dahi %50.55 apoptoz

oranı dikkat çekmektedir. MTT sonuçları da etil asetat fraksiyonunun A549 hücrelerinde yüksek sitotoksite sergilediğini göstermiştir.

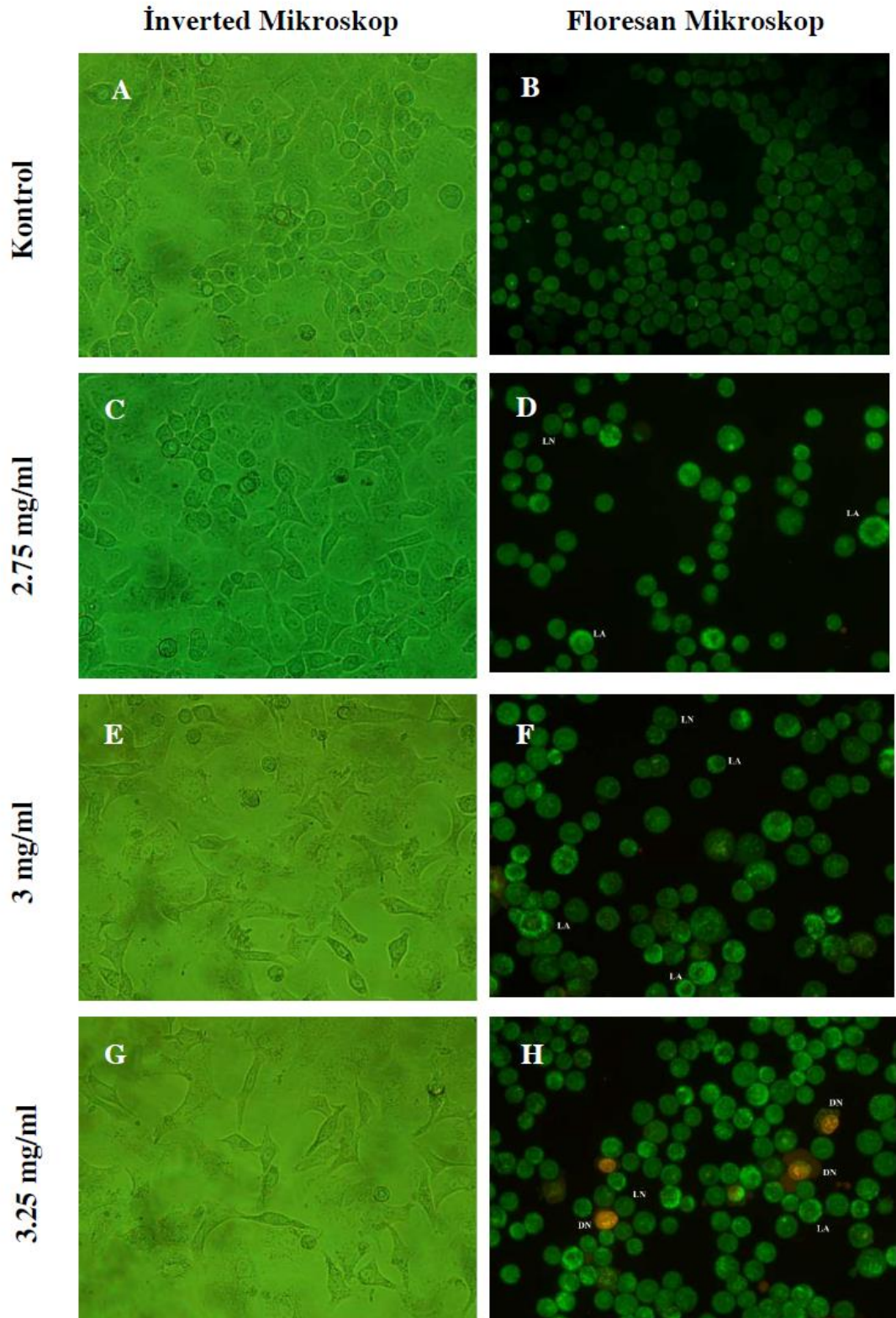
Sulu fraksiyonun uygulanan her üç dozda (2.25, 2.75, 3.25 mg/ml) da apoptotik indeks, sırasıyla; %20.40, 24.40 ve 35.00 olarak hesaplanmıştır. Kontrolde %0.4 olan nekrotik indeks, doza bağlı artış ile % 1-3 arasında değişirken ölü hücre indeksi de yine doza bağlı artış sergilemiştir. Kontrolde %3 iken sulu fraksiyon uygulandığında ölü hücre oranı en yüksek dozda %19.4'e yükselmiştir.

Demlenmiş yeşil kahvenin dozuna bağlı olarak; apoptotik, nekrotik ve ölü hücre indekslerinde kontrole göre orantılı bir artış gözlenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında, en yüksek doz 15 mg/ml'de, apoptotik indeks %42.8'e, nekrotik indeks %9 ve ölü hücre indeksi %35.4'e yükselmiştir. Ekstraksiyon yapılmayıp sadece sıcak suyla demlendiğinde, yeşil kahvenin sıcak suya bıraktığı etken bileşenlerin oranı çok daha seyreltik olmasından dolayı, ekstre ve fraksiyonlara göre daha yüksek dozlarda sitotoksik ve apoptotik etkiler gözlenmiştir. Ancak, yeşil kahvenin sıcak suyla demlenmesi sonucunda elde edilen sıvı, hem akciğer kanseri hem de mezoteliyoma hücrelerinde anlamlı şekilde sitotoksite ve apoptotik indeks sergilemiştir.

A549 hücre hattının inverted mikroskopta incelendiğinde; kontrol grubundaki hücreler yüksek oranda canlılığa sahip, hücre yoğunluğu flask yüzeyini % 80-85 kaplamış biçimdedir. Ayrıca hücreler karakteristik epitelyal hücre morfolojisi sergilemiştir. Floresan mikroskop görüntülerinde, çekirdekler spesifik kanser hücresi özelliklerini göstermiştir. Kromatin çekirdek içinde homojen dağılmış, çekirdek zarı düzgün ve yuvarlak, sadece akridin oranjla sarı-yeşil boyanmıştır. Hücre yoğunluğu da yaklaşık % 80-85'dir (Şekil 3.5.A, B).

3.4.1.1. Metanol ekstresinin A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

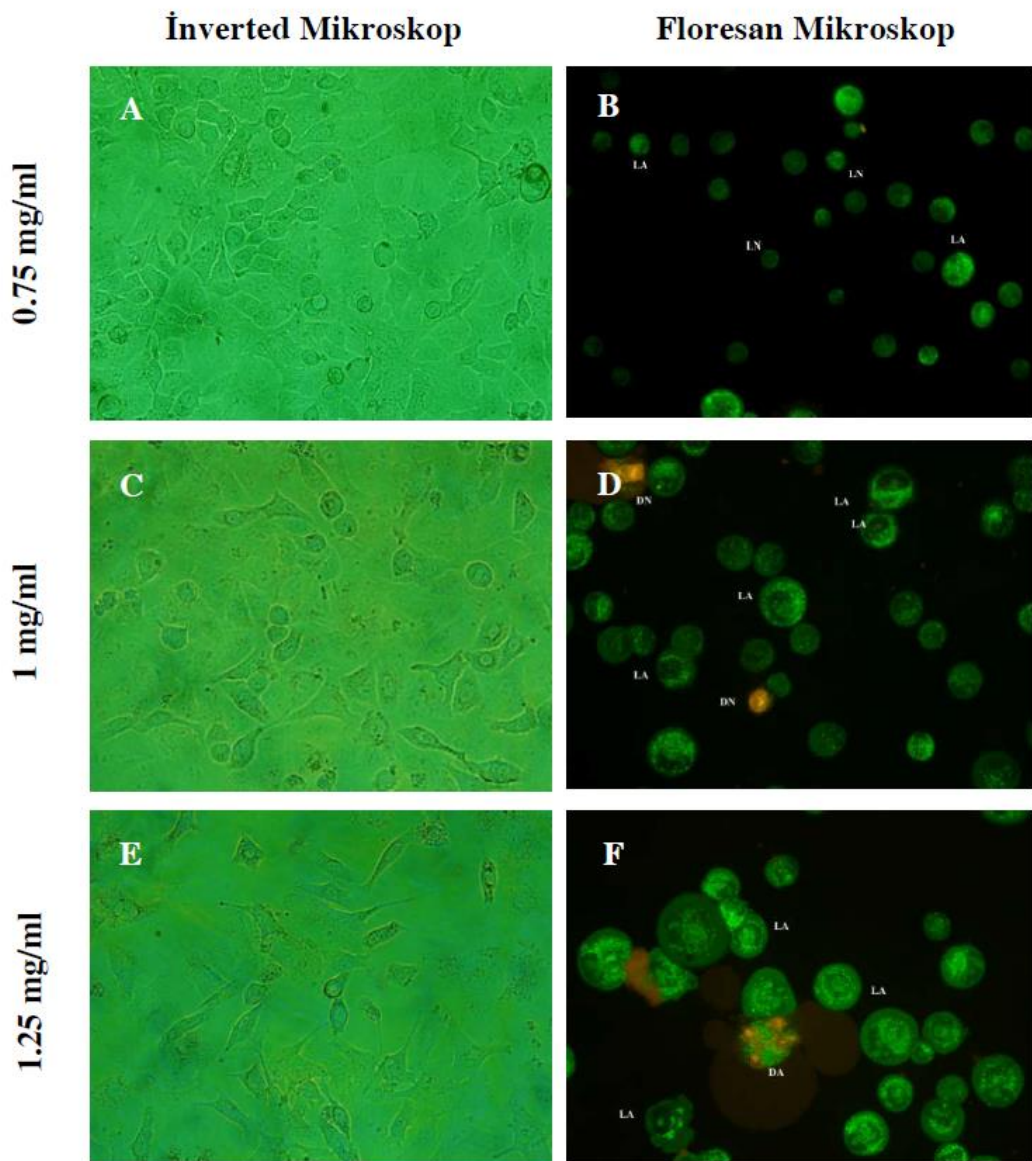
Metanol ekstresi uygulanan hücreler inverted mikroskopta incelenmiş, hücre yoğunluğunda doza bağlı azalma görülmüştür. 3 ve 3.25 mg/ml uygulanan hücreler yuvarlaklaşmış, büzülmüş ve epitel morfolojiyi kaybetmiştir (Şekil 3.5.C, E, G). Floresan mikroskopta ise yine doza bağlı apoptoz morfolojisi dikkat çekmiştir. Kromatin, çekirdek zarında yoğunlaşmış, çekirdek zarı düzensiz hal almış, 3.25 mg/ml dozunda EB ile boyanan geç apoptotik / nekrotik hücreler dikkat çekmiştir (Şekil 3.5.D, F,H).



Şekil 3.5. Metanol ekstresinin A549 hücreindeki apoptotik aktivitesi (Büyütme; 400X).

3.4.1.2. N-Bütanol fraksiyonunun A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

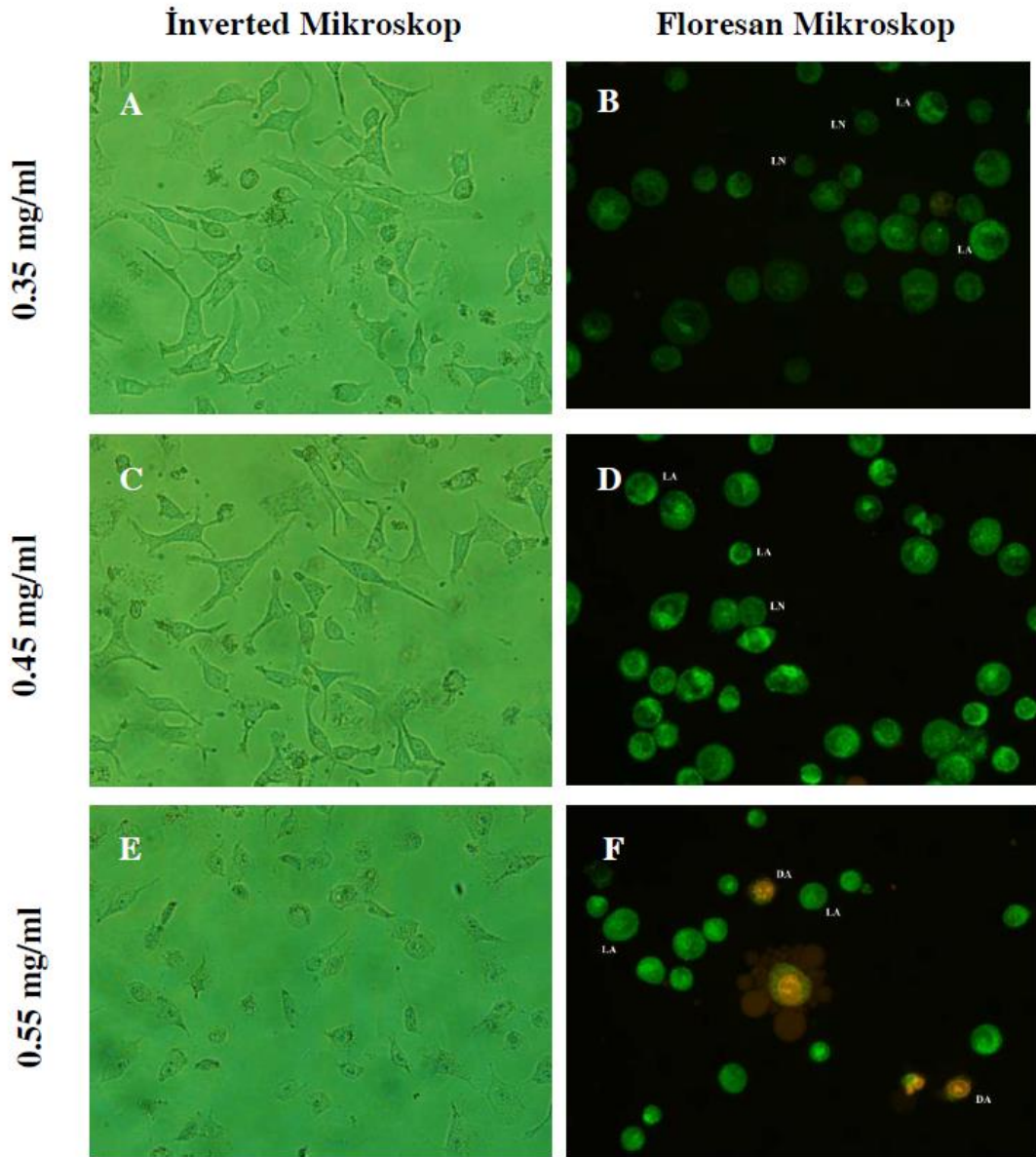
Kontrol grubuyla kıyaslandığında, n-butanol fraksiyonu uygulanan hücrelerin morfolojilerinde doza bağlı anomaliler dikkat çekmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışma oranı azalmış, şekilleri daha küresel formda ve büyük vakuollere sahip oldukları gözlenmiştir. (Şekil 3.6 A, C, E). AO/EB çift boyama yapılmış olan hücrelerde, doza bağlı olarak parçalı kromatin yapısının arttığı, kromatinin çekirdek zarı boyunca çekildiği tespit edilmiştir. 12.5 mg/ml dozunda apoptotik kesecikler artmış, çekirdek parçalanması görülmüştür (Şekil 3.6 B, D, F).



Şekil 3.6. N-Butanol fraksiyonunun A549 hücresindeki apoptotik aktivitesi Büyütme; 400X).

3.4.1.3. Etil asetat fraksiyonunun A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

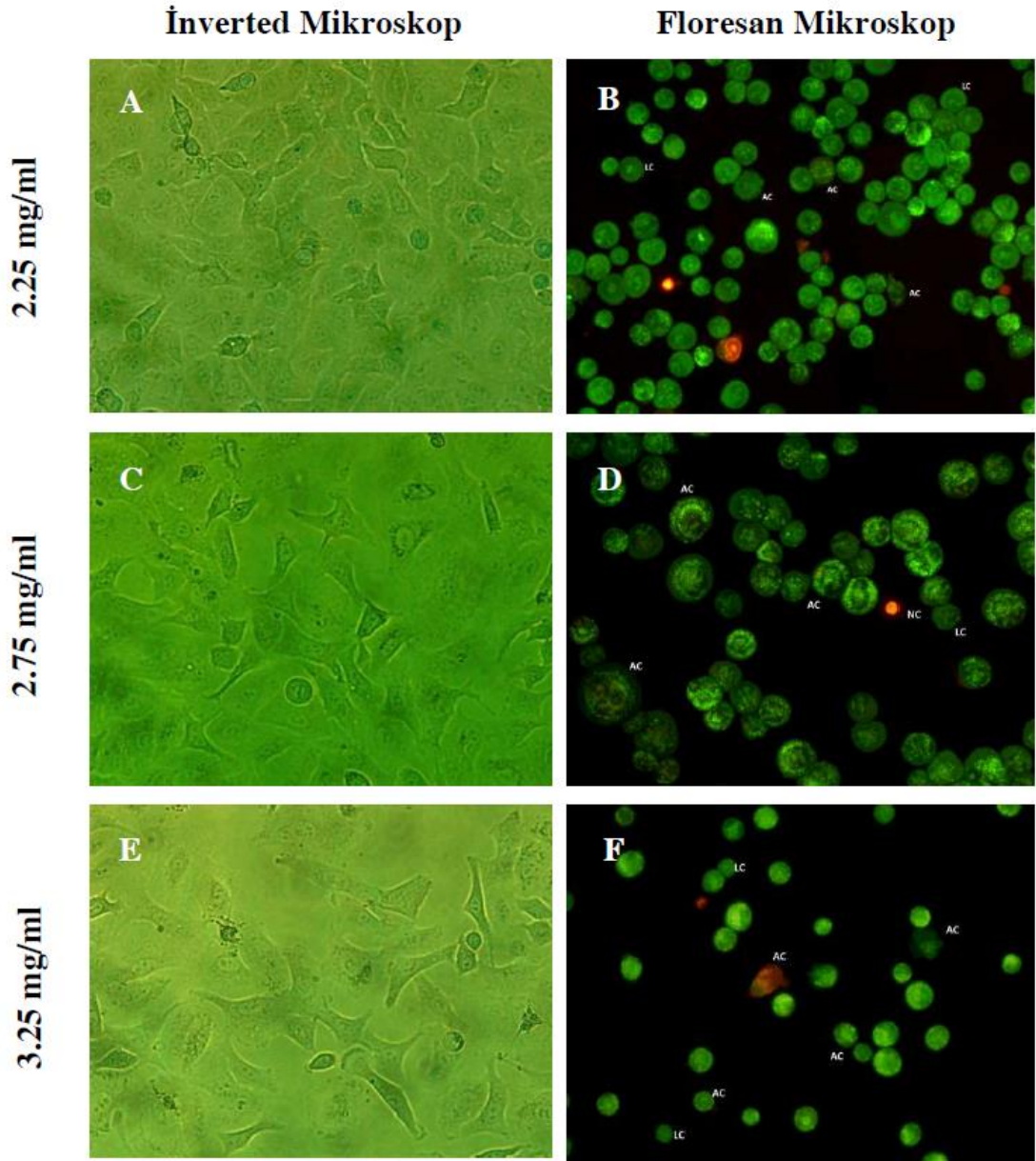
48 saat etil asetatla muamele edilen hücrelerin yoğunluğu doza bağlı olarak, kontrole oranla belirgin biçimde azalmış ve hücrelerin yüzeye yapışma oranı azalmıştır. Hücre morfolojileri yuvarlaklaşmıştır (Şekil 3.7 A, C, E). AO/EB çift boyama yapılan ve doz uygulanan hücrelerde ise doza bağlı olarak kromatin parçalanmasının arttığı, kromatinin çekirdek zarında yoğunlaştığı, hücrelerin ve çekirdeklerin büzüldüğü tespit edilmiştir. Özellikle 0.55 dozunda apoptotik keseler dikkat çekmiştir (Şekil 3.7 B, D, F).



Şekil 3.7. Etil asetat fraksiyonunun A549 hücresindeki apoptotik aktivitesi (Büyütme; 400X).

3.4.1.4. Sulu fraksiyonun A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

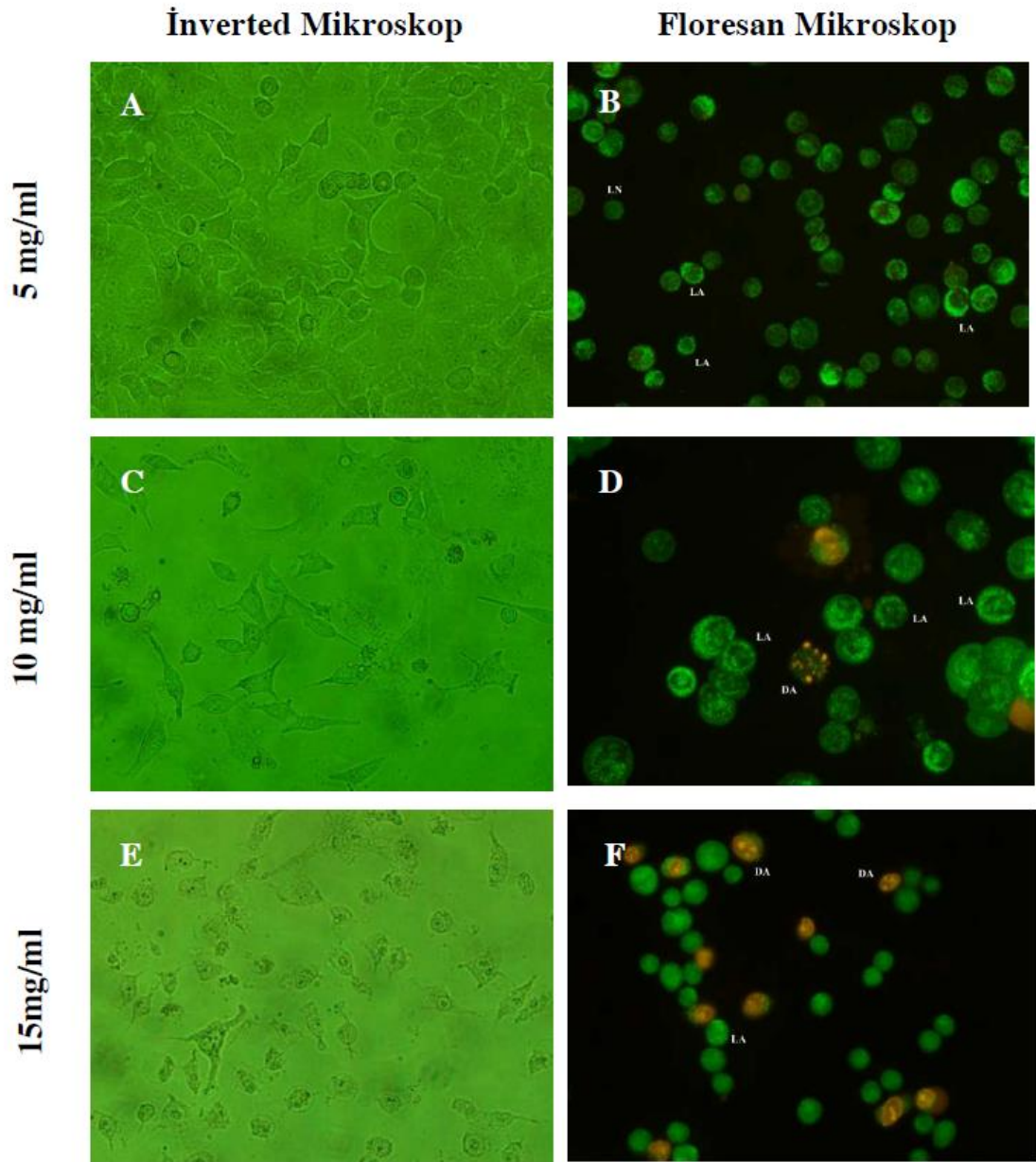
48 saat sulu fraksiyon uygulanan hücrelerde, doza bağlı olarak hücre yoğunluğu azalmış ve koful sayısı artmıştır (Şekil 3.8 A, C, E). AO/EB çift boyama yapılan hücrelerde ise doza bağlı olarak kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi apoptoz morfolojisinin yanı sıra, etidyum bromür ile boyanmış ölü hücelere de yoğun miktarda rastlanmıştır (Şekil 3.8 B, D, F).



Şekil 3.8. Sulu fraksiyonun A549 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi (Büyütme; 400X).

3.4.1.5. Demlenmiş yeşil kahvenin A549 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

Demlenmiş yeşil kahve uygulanan hücrelerde, doza bağlı olarak hücre sayısında belirgin azalma, çekirdek morfolojisinde değişim görülmüştür. Özellikle 10 ve 15 mg/ml dozlarında etidyum bromür ile boyanan hücrelerin sayısında artış dikkat çekmiştir. Apoptozun son aşaması olan apoptotik cisimcik oluşumu barizdir. Diğer yandan, hücrelerdeki büzülme ve kromatinin homojen olmayan şekilde yoğunlaşması da belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Demlenmiş yeşil kahvenin A549 hücresindeki apoptotik aktivitesi (Büyütme; 400X).

SPC-212 hücreleri

Hiç bir uygulama yapılmamış kontrol SPC-212 hücrelerinde, apoptotik indeks % 5.4, nekrotik indeks 0.4 ve ölü hücre indeksi 1.6 olarak hesaplanmıştır. Bütün ekstre ve fraksiyonların uygulandığı hücrelerde; apoptoz, nekroz ve ölü hücre indekslerinde, kontrol hücrelere kıyasla, doza bağlı 2-6 kat artış gözlenmiştir (Şekil 3.10).

Methanol ekstresi uygulanan hücrelerde 0.55-0.65 mg/ml dozları arasında apoptotik indeks %16 ile 22 arasında artış göstermiştir. Nekrotik indeks ise %1-3.8 arasında hesaplanmış, ölü hücre indeksi ise en yüksek dozda %9'a yükselmiştir. Mezotelioma hücreleri (SPC-212) metanol ekstresine karşı yüksek seviyede hassiyete sahiptir. Akciğer kanseri hücrelerinde (A549), benzer hücre ölüm oranları yaklaşık 10 katı daha yüksek dozlarda elde edilmiştir. MTT sonuçları da bu bulguyu desteklemektedir. SPC-212 hücreleri A549 hücrelerinden çok daha düşük metanol ekstresi dozlarında sitotoksik etki sergilemişlerdir.

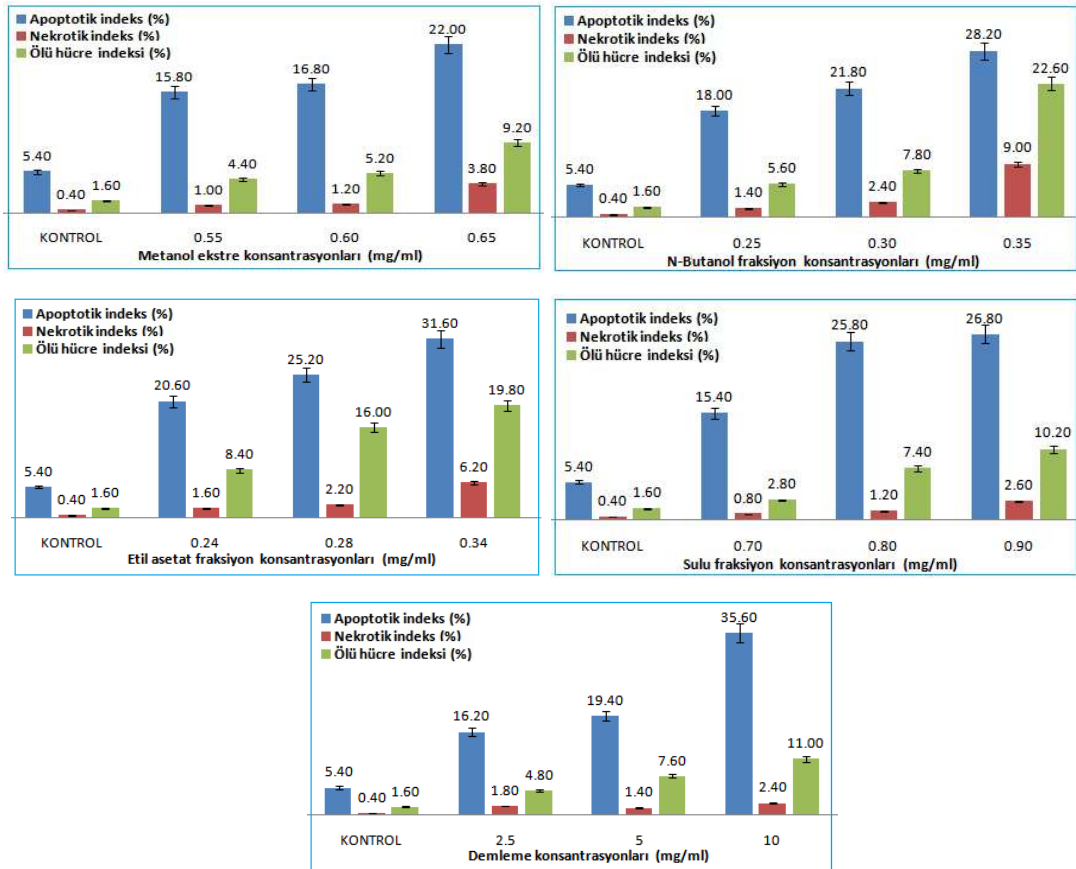
N-butanol fraksiyonu uygulanan hücrelerde ise apoptoz indeksi 0.25-0.35 mg/ml dozları arasında % 18'den % 28.2'ye yükselmiştir. Nekrotik hücre indeksi % 1.4'den % 9'a doza bağlı artış gösterirken ölü hücre indeksi % 5.6'dan doza bağlı olarak 22.6'ya yükselmiştir. Mezotelioma hücresi n-bütanol fraksiyonuna karşı da yine yüksek hassasiyete sahiptir. A549 akciğer kanseri hücrelerinin üçte biri daha düşük dozlarda çok daha yüksek apoptoz ve hücre ölüm indeksi sergilemiştir. Sonuçlar nekrotik indeks bakımından da benzerdir. Yaklaşık üçte biri konsantrasyonlarda bile A549 hücreleridekine eşit bir oran gözlenmiştir.

Etil asetat fraksiyonu uygulandığında SPC-212 hücrelerinde apoptoz indeksi doz abaglı olarak %20.6'dan %31.6'ya yükselmiştir. Nekrotik indeks; %1.6'dan %6.2'ye yükselirken ölü hücre indeksi de %8.4'den %19.8'e çıkmıştır. A549 hücreler ile kıyaslandığında, SPC-212 hücrelerinde uygulanan ve yaklaşık %20 oranında apoptoz ölçülen en yüksek etil asetat dozu (0.34 mg/ml), A549 hücrelerinde en düşük doz olarak uygulanmıştır ve apoptoz oranı daha düşük (%14.5) ölçülmüştür. Etil asetat fraksiyonuna karşı mezotelioma hücrelerinin daha yüksek hassasiyete sahip olduğu görülmüştür.

Sulu fraksiyon uygulamasında ise; % 15.4-26.8 apoptoz indeksi hesaplanmıştır, nekrotik indeks en yüksek dozda % 2.6'ya yükselmiş ve hücre ölüm indeksi de sulu fraksiyon uygulanan mezotelioma hücrelerinde %2.8'dan %10.20'ya doza bağlı

artmıştır. Yine A549 ile kıyaslandığında, SPC-212 hücrelerinde en yüksek sulu faz dozu (0.9 mg/ml)'nin etkisiyle elde edilen % 26.8'lik apoptoz indeksi, A549 hücrelerine uygulanan en düşük doz (2.25 mg/ml)'da hesaplanan apoptoz yüzdesinden (%20.4) daha yüksektir. SPC-212 hücreleri sulu fraksiyona karşı da yüksek hassasiyet göstermiştir.

Demlenmiş yeşil kahve uygulandığında; SPC-212 hücrelerindeki apoptoz indeksi doza bağlı olarak, %16.2'den % 35.6'ya yükselmiştir. Nekrotik indeks ise % 1.8'den % 2.4'e yükselirken ölü hücre indeksi ise %4.8'den %11'e yükselmiştir. A549 hücreleriyle kıyaslandığında, diğer ekstre ve fraksiyonların aksine, demlenmiş yeşil kahve'nin her iki hücrelerde de benzer apoptoz ve nekroz indeksi sergilemiştir. Ancak, A549 hücrelerinin biraz daha fazla hassasiyet sergilediği, toplam hücre ölüm oranının daha yüksek olduğu görülmüştür.



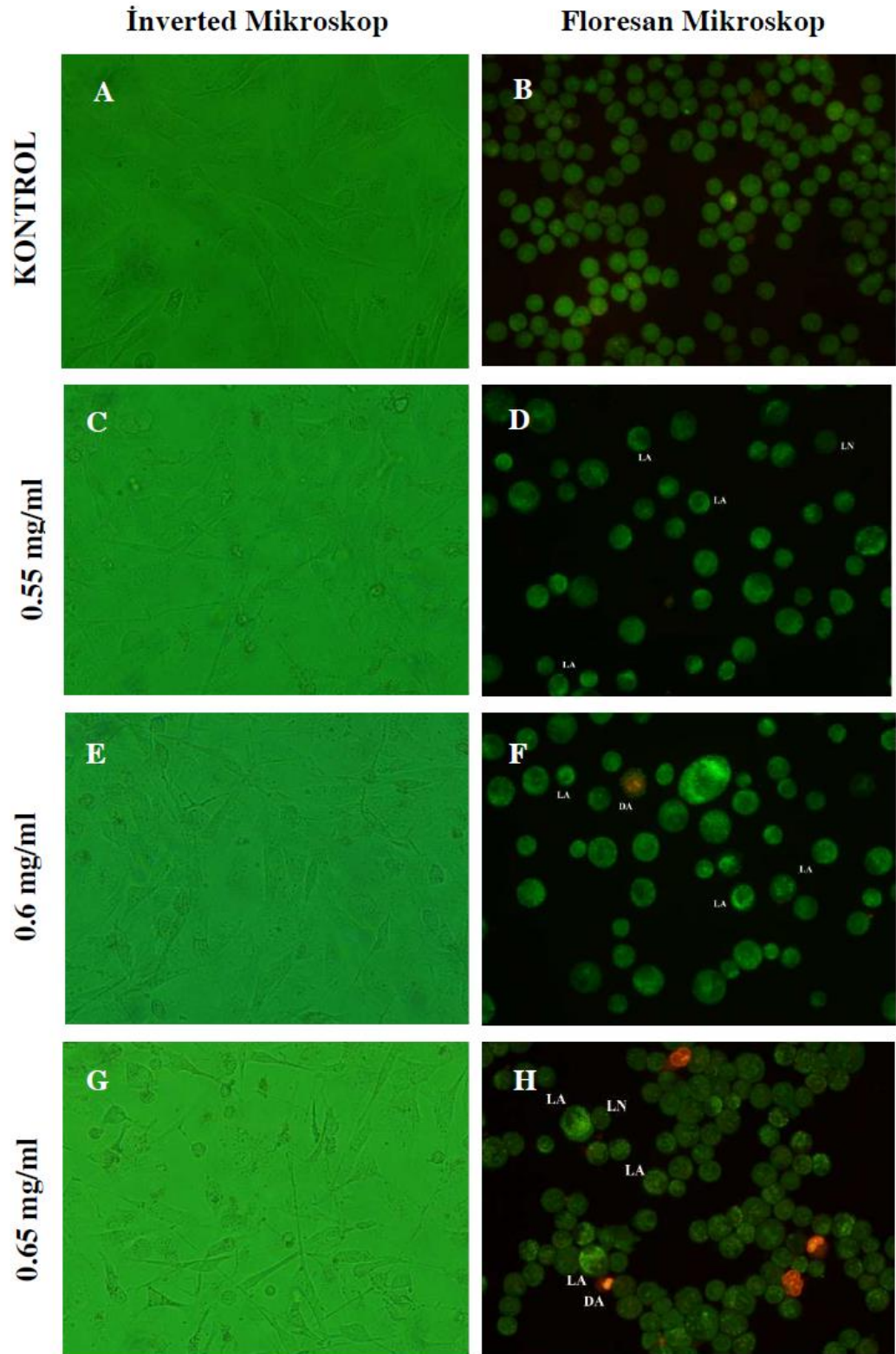
Şekil 3.10. Yeşil kahve metanol ekstresi ve fraksiyonlarının SPC-212 hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve ölü hücre indeksleri.

SPC-212 hücre hattının İnverted mikroskopta ve AO/EB çift boya ile boyandıktan sonra floresan mikroskopta incelenmesiyle; Şekil 3.11. A ve B'deki

fotoğraflar elde edilmiştir. Kontrol grubundaki hücreler, yüksek oranda canlılığa sahip, hücre yoğunluğu flask yüzeyini %80-85 oranında kaplamış biçimdedir. Ayrıca hücreler karakteristik epitelyal hücre morfolojisi sergilemiştir. Floresan mikroskop görüntülerinde, çekirdeklerin hızlı bölünen kanser hücrelerinin özelliklerini gösterdiği belirgindir. Kromatin iplik çekirdek içinde homojen dağılmış, çekirdek zarı düzgün ve yuvarlak, sadece akrinin oranı boyasıyla sarı-yeşil boyanmıştır.

3.4.1.6. Metanol ekstresinin SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

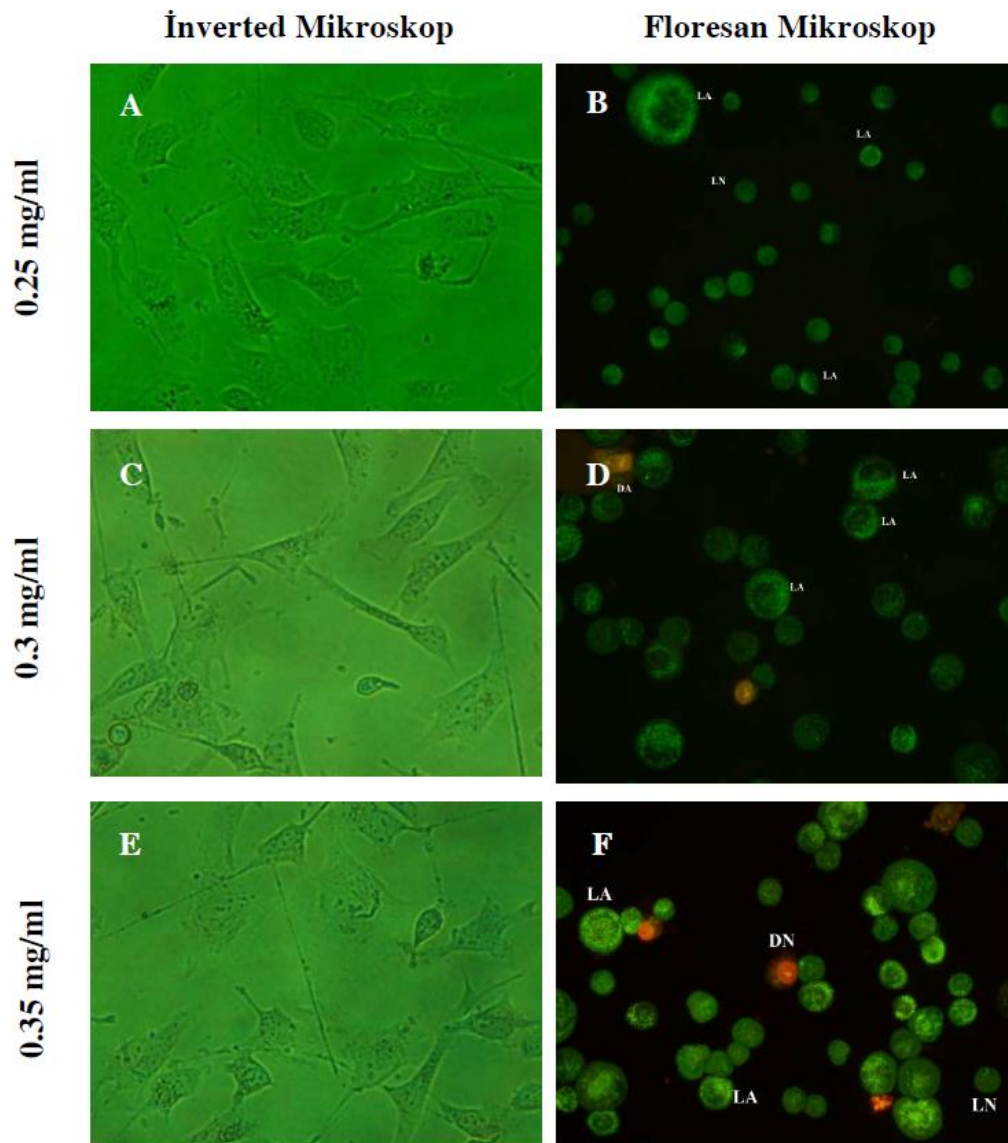
Metanol ekstresi uygulanan hücrelerde, inverted mikroskop görüntülerine göre, hücre yoğunluğunda doza bağlı olarak azalma meydana gelmiştir ve yüzeye yapışma oranı azalmıştır. Flask yüzeyinde sayısı azalan hücrelerin diğer hücrelerin zarlarıyla temas kurabilmek için sitoplazmik uzantılarında artma dikkat çekmektedir. Özellikle 0.65 mg/ml dozunda hücrelerdeki hasar belirgin şekilde görülmüştür. Karakteristik şeklini kaybedip yuvarlaklaşmış hücreler görülmektedir (Şekil 3.11. C, E, G). Floresan mikroskopta incelendiğinde ise, 0.55 mg/ml dozunda kromatin yapısında yoğunlaşma başlamışken 0.6 ve 0.65 mg/ml dozlarında apoptoz morfolojisi tamamen belirgindir. EB ile boyanmış apoptotik cisimcikler de yine belirgindir (Şekil 3.11. D, F, H).



Şekil 3.11. Metanol ekstresinin SPC-212 hücresindeki apoptotik aktivitesi (Büyütme; 400X).

3.4.1.7. N-bütanol fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

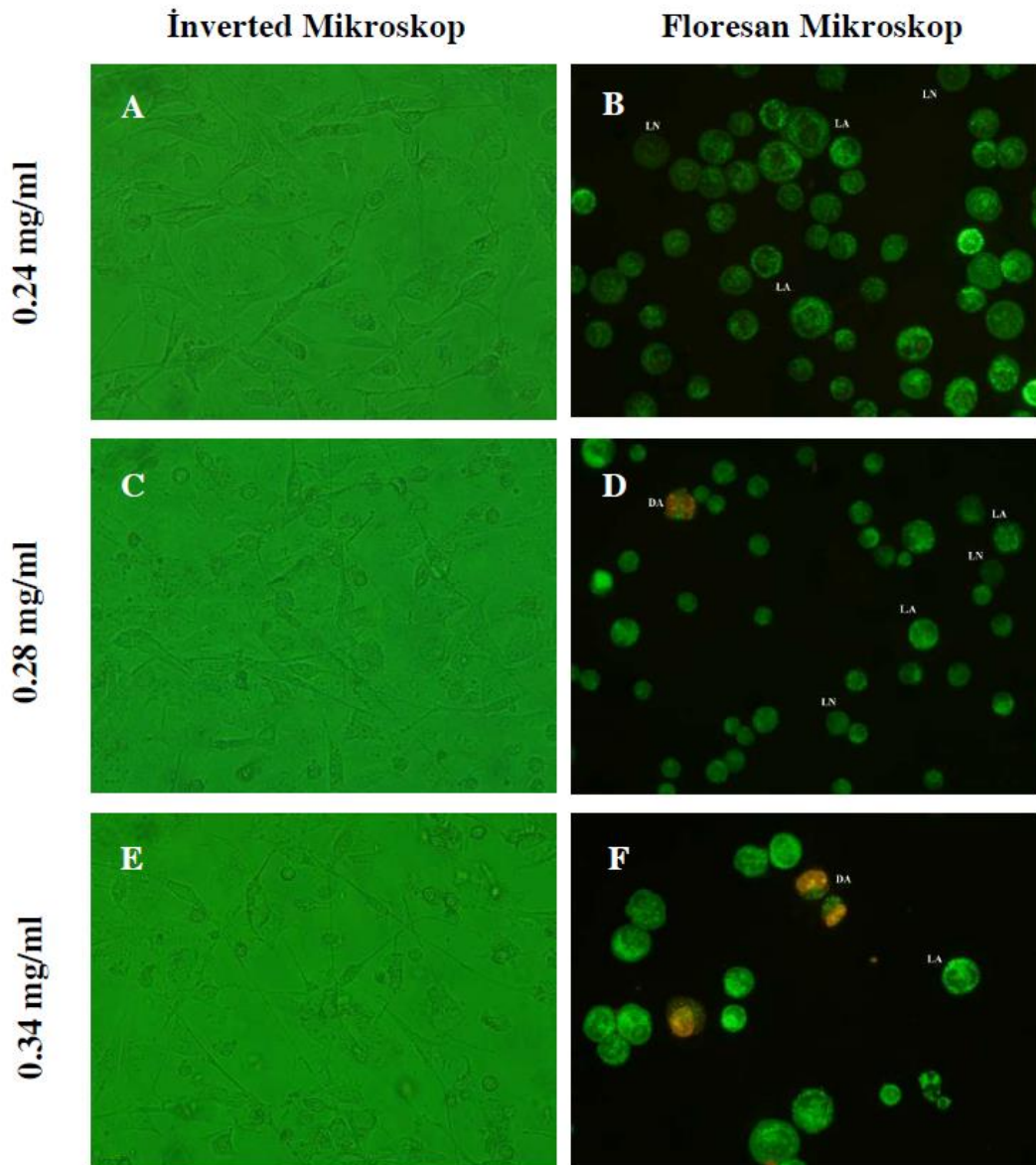
Inverted mikroskopta incelenen N-bütanol uygulanmış hücrelerin canlılığında ve flastaktaki yoğunluğunda doza bağlı azalma gözlenmiştir. İlk dozdan itibaren, morfolojilerdeki anomali belirgindi ve giderek artmıştır. Sitoplazmada vakueller artmış ve yüksek dozda ise hücreler büzülmüştür (Şekil 3.12. A, C, E). Floresan mikroskopta incelendiğinde, 0.3 ve 0.35 mg/ml dozlarında kromatin yoğunlaşması oldukça belirgindir. En fazla göze çarpan büzülmüş hücrelerin çekirdekleri ve çekirdek zarının çevresindeki düzensizliktir. EB ile boyanmış olan apoptotik cisimcikler doza bağlı artmıştır (Şekil 3.12. B, D, F).



Şekil 3.12. Butanol fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi(Büyütme; 400X).

3.4.1.8. Etil asetat fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

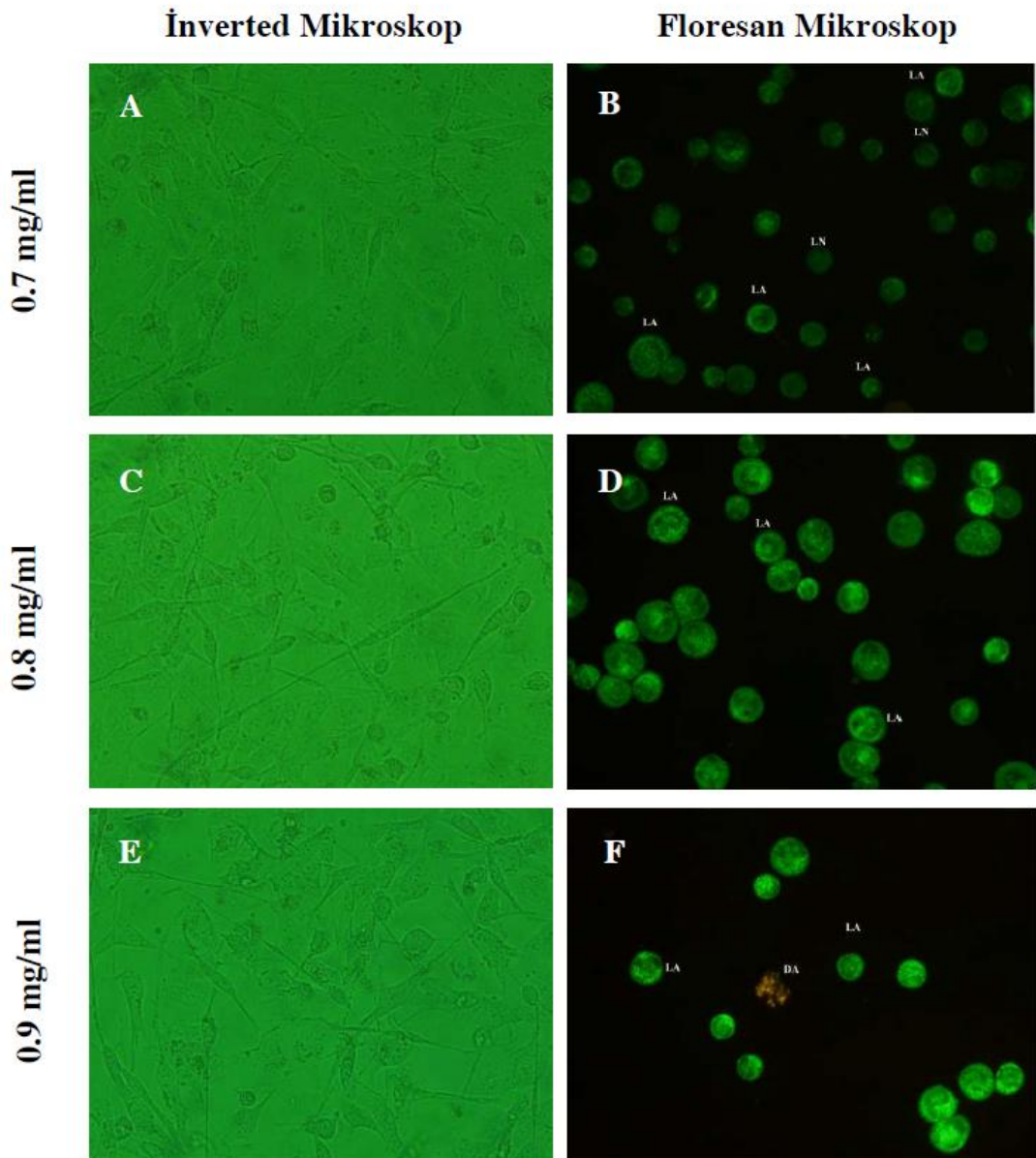
İnverted mikroskopta incelenen Etil asetat fraksiyonu uygulanan hücrelerin yoğunluğunda belirgin bir azalma gözlenmiştir. İlk dozdan itibaren, morfolojilerdeki değişimde giderek artmıştır. 0.28 ve 0.34 mg/ml etil asetat uygulanan hücrelerde sitoplazmik vakueller artmış ve hücre büzülmesi artmıştır (Şekil 3.13.A, C, E). Floresan mikroskopta incelendiğinde, 0.24 ve 0.28 ve 0.34 mg/ml etil asetat etkisiyle kromatin, çekirdek zarında yoğunlaşmış ve büzülmüştür. EB ile boyanmış olan apoptotik cisimcikler 0.34 mg/ml dozda artmıştır (Şekil 3.13.B, D,F).



Şekil 3.13. Etil asetat fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi (Büyütme; 400X).

3.4.1.9. Sulu fraksiyonunun SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

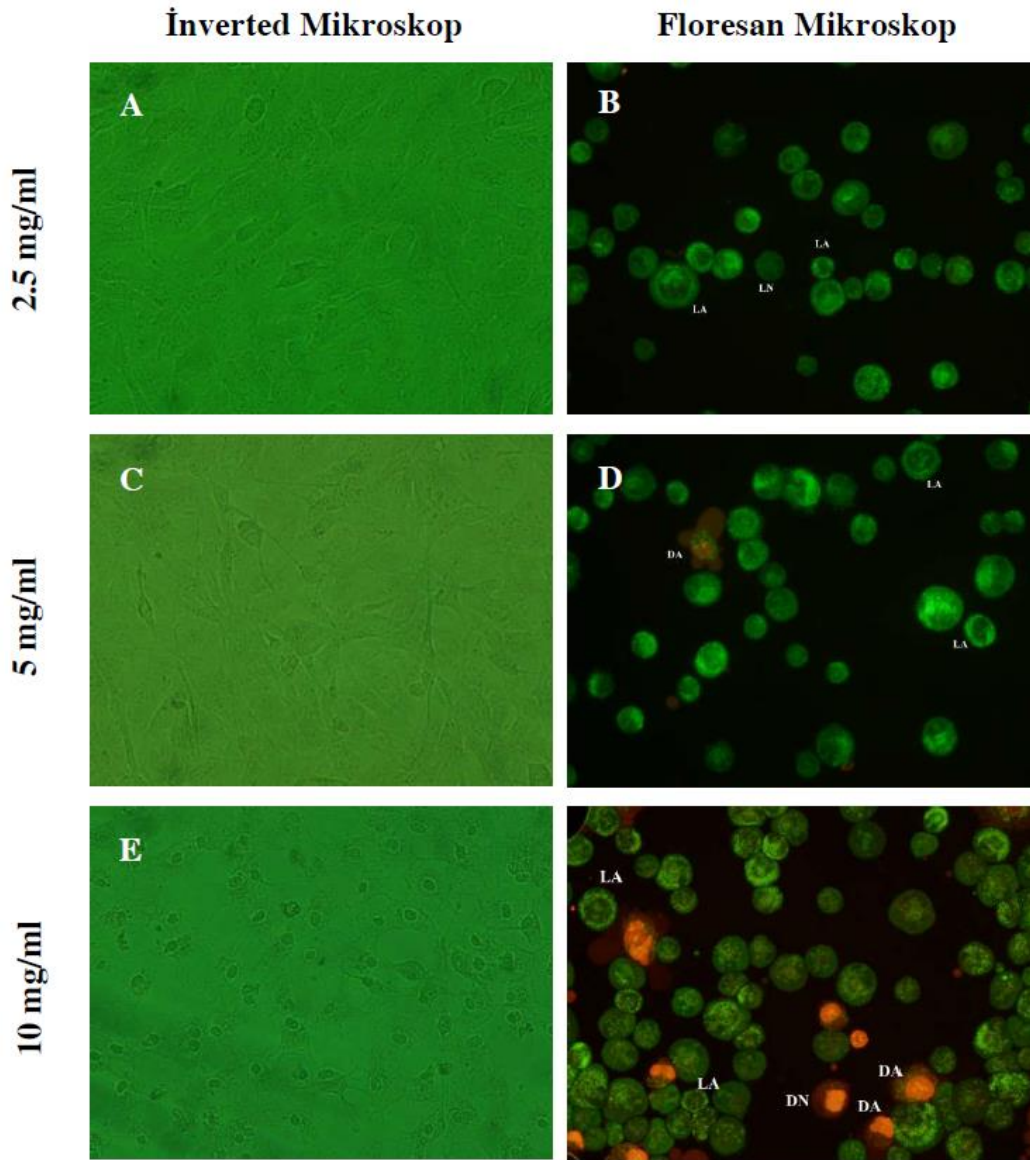
Sulu fraksiyon uygulanan hücreler inverted mikroskopta incelendiğinde, canlı hücrelerin sayısında doza bağlı olarak azalma görülmüştür. Diğer yandan, hücrelerin büzüldüğü, yuvarlaklaştığı dikkat çekmiştir. 0.9 mg/ml dozunda sitoplazmik vakuoller de artmıştır (Şekil 3.14.A, C, E). Floresan mikroskop fotoğrafları incelendiğinde, bütün dozlarda kromatin çekirdek zarı boyunca toplanmıştır. Çekirdek yüzeyi düzensiz ve homojenliği azalmıştır (Şekil 3.14.B, D, F).



Şekil 3.14. Sulu fraksiyonun SPC-212 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi (Büyütme; 400X).

3.4.1.10. Demlenmiş yeşil kahvenin SPC-212 hücrelerindeki apoptoz aktivitesi

Demlenmiş yeşil kahve uygulandığı hücreler inverted mikroskop ile incelendiğinde, 2.5 ve 5 mg/ml’da hücre sayısı kontrolden farklı değildir. 10 mg/ml’de ise hücre sayısında belirgin bir azalma görülmüştür. Ayrıca, 10 mg/ml’deki hücrelerin tamamı yuvarlaklaşmış ve apoptotik cisimcikler yoğun biçimde görülmüştür. Floresan mikroskopta incelendiğinde ise bütün dozlarda kromatin yoğunlaşması yüksek seviyededir. 10 mg/ml’de apoptotik cisimcikler son derece yüksektir.



Şekil 3.15. Demlenmiş yeşil kahvenin SPC-212 hücrelerindeki apoptotik aktivitesi (Büyütme; 400X).

3.5. Kaspaz Enzim Aktivasyonlarının Ölçülmesi

3.5.1. A549 hücreleri

Kaspaz-8

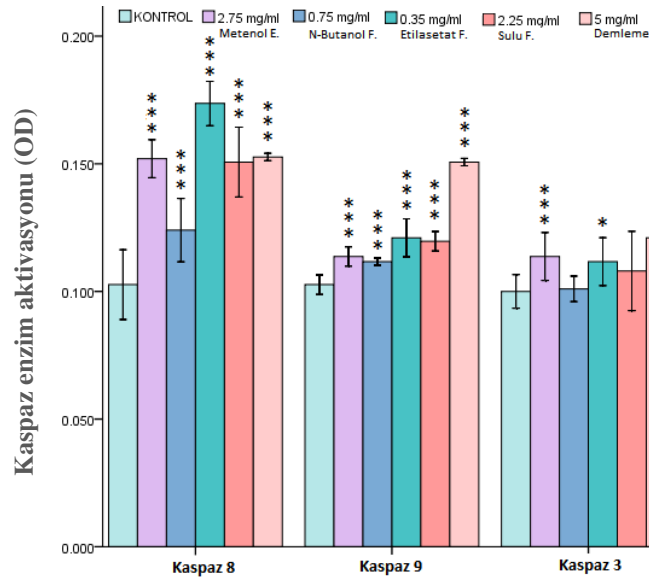
Kontrol grubunda kaspaz-8 aktivitesi 0.104 OD olarak belirlenmiştir. Uygulanan her bir dozda kaspaz-8 aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında; Etil asetat (0.35 mg/ml)'ın kontrole göre 1.673 kat artarak, en yüksek kaspaz-8 aktivasyonu gösterdiği belirlenmiştir (0.174 OD). Metanol ekstresi (2.75 mg/ml), sulu fraksiyon (2.25 mg/ml) ve demlenmiş yeşil kahvede (5 mg/ml) uygulanan hücrelerde de kaspaz-8 aktiviteleri sırasıyla 0.152, 0.151, 0.153 OD olarak tespit edilmiştir ve her biri yaklaşık 1.5 kat artış göstermiştir. N-butanol fraksiyonu (0.75 mg/ml) uygulandığında ise kaspaz-8 aktivitesi (0.124 OD) diğerlerine göre en az seviyede çıkmış olmasına rağmen, kontrole göre 1.192 kat artmıştır (Şekil 3.16).

Kaspaz-9

Kontrol grubunun kaspaz-9 aktivitesi 0.103 olarak belirlenmiştir. Uygulanan her bir yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarında kaspaz-9 aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında; demlenmiş yeşil kahvede (5 mg/ml) en yüksek kaspaz-9 aktivitesi (0.151 OD) gösterdiği belirlenmiştir. Etil asetat (0.35 mg/ml) ve sulu fraksiyon (2.25 mg/ml) uygulanan hücrelerde kaspaz-9 aktivasyonu kontrole göre sırasıyla 1.174, 1.165 kat artış göstermiştir (etil asetat fraksiyonu 0.121 ve sulu fraksiyon 0.120 OD). N-butanol fraksiyonu (0.75 mg/ml) ve metanol ekstresi (2.75 mg/ml) uygulamalarında, hücrelerdeki kaspaz-9 aktivasyonu sadece sırasıyla 1.087, 1.106 kat artmıştır (metanol ekstresi 0.114 ve N-butanol fraksiyonu 0.112 OD) (Şekil 3.16).

Kaspaz-3

Kontrol grubunun kaspaz-3 aktivitesi 0.100 OD olarak belirlenmiştir. Butanol ekstresi ve sulu ekstre dışında, uygulanan her bir dozda zayıf oranda kaspaz-3 aktivitesi tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında; demlenmiş yeşil kahve (5 mg/ml) uygulanmış hücrelerde, 1.21 katlık artış ile en yüksek kaspaz-3 aktivasyonu (0.121) gösterdiği belirlenmiştir. Diğer fraksiyonların hepsinde kaspaz-3 aktivasyonu kontrole göre 1-1.1 katlık artış göstermiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Yeşil kahve ekstraktları uygulanan A549 hücrelerinde kaspaz aktivasyonu (*: Kontrolle göre anlamlı fark; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ (Tukey)).

3.5.2. SPC-212 hücreleri

Kaspaz-8

Kontrol grubunun kaspaz-8 aktivitesi 0.09 (OD) olarak belirlenmiştir. Uygulanan her bir dozda kaspaz-8 aktivitesi tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre; etil asetat fraksiyonu (0.24 mg/ml) 1.555 katlık artış göstererek (0.140 OD) en yüksek kaspaz-8 aktivitesi göstermiştir. Metanol ekstresi (0.55 mg/ml) uygulandığında, kaspaz-8 aktivitesi 0.114 OD ile 1.266 katlık artış göstermiştir. N-butanol fraksiyonu (0.25 mg/ml), sulu fraksiyon (0.70 mg/ml) ve demlenmiş yeşil kahve (2.50 mg/ml) uygulandığında 0.120 OD ile 1.333 kat artış göstermiştir. Metanol ekstresi (0.55 mg/ml) uygulanan hücrelerde ise 0.114 OD ile kontrole göre 1.266 kat artış göstermiştir (Şekil 3.17).

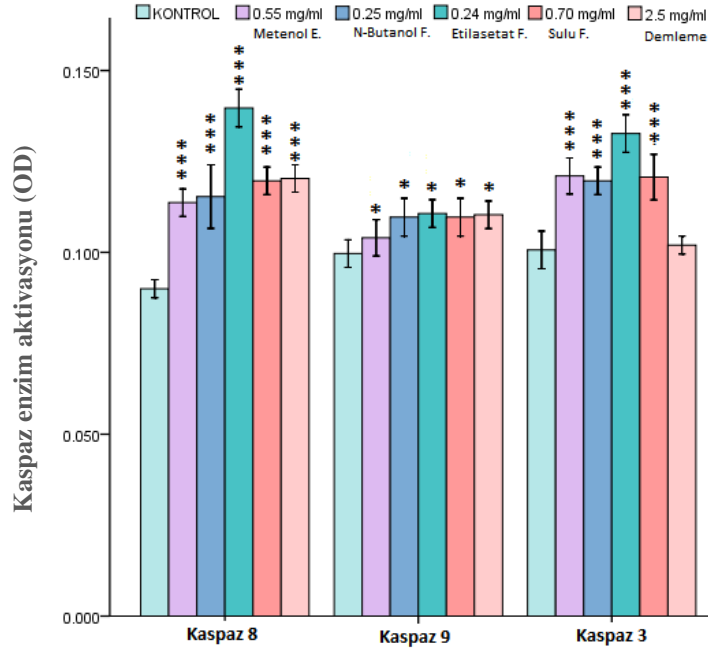
Kaspaz-9

Kontrol grubunun kaspaz-9 aktivitesi 0,1 olarak belirlenmiştir. Uygulanan metanol ekstresi dışında her bir dozda kaspaz-9 aktivitesi tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre, uygulanan her bir fraksiyonda kaspaz-9 aktivitesine 1-1.1 katlık artış görülmektedir (Şekil 3.17).

Kaspaz-3

Kontrol grubunun kaspaz-3 aktivitesi 0.101 OD olarak belirlenmiştir. Demlenmiş yeşil kahve uygulanan hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonunda artış olmamıştır.

Etil asetat fraksiyonu (0.24 mg/ml) uygulandığında, kontrole göre 1.316 katlık artış olmuştur (0.133 OD). Diğer 3 fraksiyon (metanol, n-butanol ve sulu fraksiyonlar), kontrole göre sırasıyla 1.198, 1.188, 1.198 katlık kaspaz-3 aktivasyonu (sırasıyla 0.121, 0.120, 1.198 OD) göstermiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Yeşil kahve ekstraktları uygulanan SPC-212 hücre hattında kaspaz aktivasyonu (*: Kontrole göre anlamlı fark; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ (Tukey)).

3.6. Anneksin V/FITC-PI Analizi

Yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarının IC_{50} değerleri uygulanmış ve AnnexinV-FITC-PI ile işaretlenmiş hücreler akım sitometri (BD FACSaria) cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonuçları, kadranlı noktasal grafiğe çevrilmiş ve Şekil 3.18 ve Şekil 3.19’de verilmiştir. Kadranlı noktasal grafikte;

Q1; PI ile boyanan hücreleri;

Q2; hem anneksin V/FITC hemde PI ile boyanan hücreleri;

Q3; boyanmayan hücreleri;

Q4; anneksin V/FITC ile boyanan hücreleri temsil etmektedir.

Hücre zarının sitoplazmik bölümünde bulunan fosfotidil serin’in erken apoptozda dış yüzeye translokasyonunu belirlemek, yani erken apoptozu belirlemek amacıyla yapılan bu analizin sayısal verileri Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3’de sunulmuştur.

3.6.1. A549 hücresi

Test maddesi uygulanmamış kontrol hücrelerinde, hiçbir boyayla boyanmamış sağlıklı hücre oranı %97'dir. Annexin V-FITC ile boyanan apoptotik hücre oranı %0.6, PI ile boyanan nekrotik hücre oranı % 0.5 ve her iki boyayla boyanmış olan geç apoptotik ya da nekrotik hücre oranı da %1.7 dir.

Çizelge 3.2. Yeşil kahve uygulanmış A549 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi.

(%)	Kontrol	Metanol ekstresi 3 mg/ml	Butanol fraksiyonu 1 mg/ml	Etil asetat fraksiyonu 0.45 mg/ml	Sulu fraksiyonu 2.75mg/ml	Demleme 10 mg/ml
Q1	0.5	1,1	1,6	4,8	1,0	8,6
Q2	1,7	6,0	2,9	28,7	11,0	32,4
Q3	97,3	91,2	94,3	57,2	84,5	48,8
Q4	0,6	1,8	1,2	9,3	3,5	10,1

Yeşil kahvenin metanol ekstresi uygulanmış A549 hücrelerinde, kontrol grubuyla kıyaslandığında, Annexin V-FITC ile boyanan yani fosfotidil serin ile reaksiyona giren apoptotik hücrelerin oranı %1.8'dir. %6 oranında ise hem Annexin V-FITC hem de PI ile boyanan geç apoptotik ya da nekrotik hücre hesaplanmıştır. %1 oranında da sadece PI ile boyanan nekrotik hücrelere bulunmuştur. Aynı dozda metanol ekstresi 48 saat süreyle uygulanıp AO/EB ile boyanmış hücrelerde apoptoz indeksi % 23 iken, Annexin V-FITC ile boyanan (erken apoptotik) hücre oranı çok daha düşüktür, geç apoptoz oranı ise 6 kat daha yüksektir. Bu durumun sebebi, AO/EB testi ile hücrelerin geç apoptozdaki morfolojik değişimlerinin belirlenebilmesidir.

N-butanol fraksiyonu uygulanmış hücrelerde %1.2 oranında apoptotik hücreye, %1.6 nekrotik hücre ve %3'de geç apoptoz ya da nekrotik hücreye rastlanmıştır. 1 mg/ml N-bütanol fraksiyonu uygulanan ve 48 saat sonra AO/EB ile boyanan hücrelerde de Apoptotik indeks %19.4 olarak belirlenmiştir. N-bütanol uygulanan hücrelerde Annexin V-FITC ile boyanan (erken apoptotik) hücre oranı düşük, PI ile boyanan (geç apoptotik) hücre oranı yaklaşık 2 kat daha yüksektir.

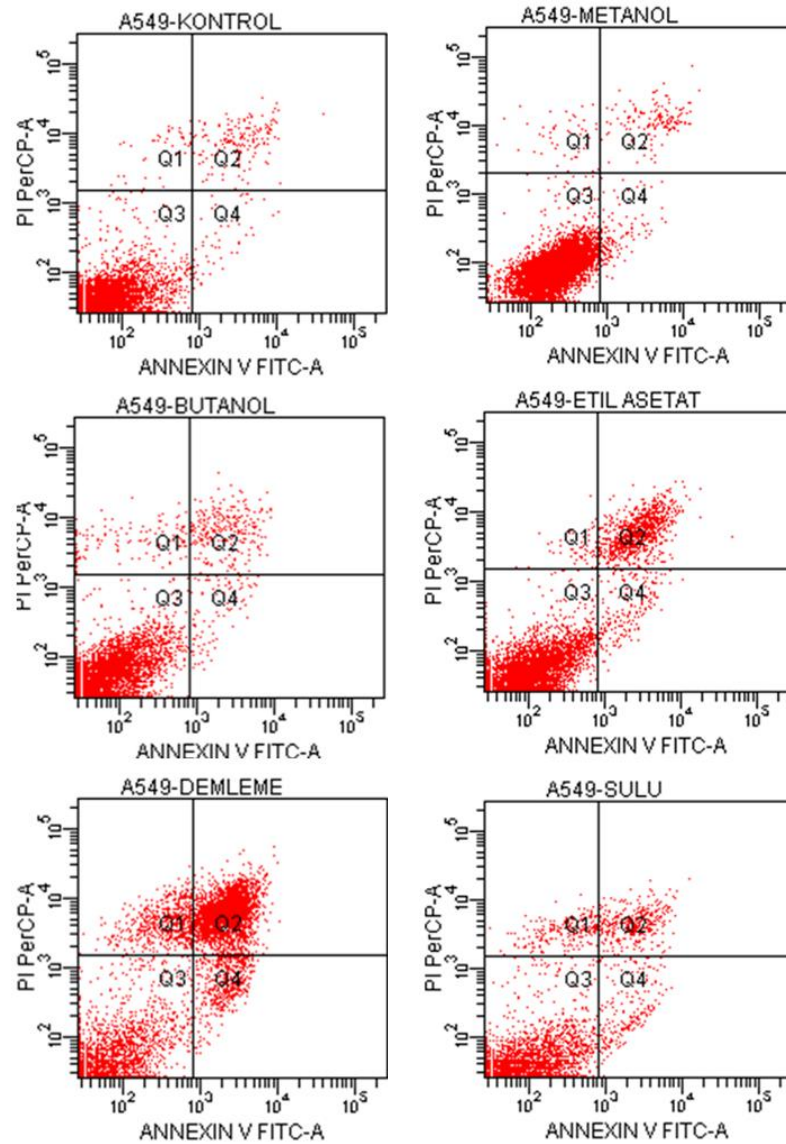
Etil asetat fraksiyonu uygulanan hücrelerde apoptotik hücre oranı %9.3 olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, geç apoptoz/geç nekroz oranı yaklaşık %29'dur. Nekroz oranı ise yaklaşık %5'tir. Aynı dozun AO/EB boyanmasıyla yapılan morfolojik incelemede apoptoz indeksi %35 civarındadır.

Sulu fraksiyon uygulandığında ise apoptoz oranı %3.5, nekroz oranı %1 ve geç apoptoz/geç nekroz oranı ise %11 olarak bulunmuştur. AO/EB çalışmasında aynı dozda

apoptotik indeks %24.5'dir.

10 mg/ml demlenmiş yeşil kahve uygulandığında apoptoz oranı %10 olarak bulunmuştur. Kontrole göre oldukça yüksek bir orandır. Nekroz oranı %8.6 ve geç apoptoz/geç nekroz oranı ise %32.4'dür. Bu sonuçlar AO/EB deneyindeki sonuçlarla oldukça benzerdir.

AO/EB morfolojik incelemelerde geç apoptozun belirlendiği göz önüne alındığında, hücre akış sitometrisi çalışması ile AO/EB çalışmasının sonuçları birbirleriyle uyumludur.



Şekil 3.18. Yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarının uygulandığı A549 hücrelerinde annexin V-FITC/PI akım-sitometrik analizi.

3.6.2. SPC-212 hücresi

Test maddesi uygulanmamış kontrol hücrelerinde, hiçbir boyayla boyanmamış SPC-212 hücre oranı %95.4'dür. Annexin V-FITC ile boyanmış apoptoz oranı % 0.6 ve PI ile boyanan nekroz oranı da % 2.4'dür. Her iki boyayla boyanmış olan geç apoptotik ya da nekrotik hücre oranı da % 1.6 dir.

Çizelge 3.3. Yeşil kahve uygulanmış SPC-212 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi.

(%)	Kontrol	Metanol ekstresi 0.6 mg/ml	Butanol fraksiyonu 0.3 mg/ml	Etil asetat fraksiyonu 0.28 mg/ml	Sulu fraksiyonu 0.8 mg/ml	Demleme 5 mg/ml
Q1	2,4	4,6	4,0	3,5	5,4	3,6
Q2	1,6	5,3	3,7	24,7	2,8	31,2
Q3	95,4	88,1	90,0	70,4	90,0	64,0
Q4	0,6	2,0	2,4	1,4	1,8	1,2

Metanol ekstresi uygulandığında, apoptoz oranı %2'dir. Nekroz oranı %4.6 ve geç apoptoz oranı da %5.3'dür. Kontrol ile kıyaslandığında, hem apoptoz hem de geç apoptoz/geç nekroz oranları yaklaşık 3.5 kat artmıştır. Nekroz oranı ise yaklaşık 2 kat artmıştır. AO/EB ile analizinde aynı dozda apoptoz indeksi yaklaşık %17'dir. Hücre akış sitometrisi deneylerinde; metanol ekstresi uygulanan A549 ve SPC-212 hücrelerinde benzer apoptoz ve nekroz oranları ölçülmüştür.

N-bütanol fraksiyonu uygulandığında; kontrole kıyasla, % 2.4 apoptoz oranıyla 4 kat artış gözlenmiştir, %3.7 geç apoptoz/geç nekroz oranı yaklaşık 2.5 kat artmıştır ve %4'de nekroz oranıyla 1.5 kat artış belirlenmiştir.

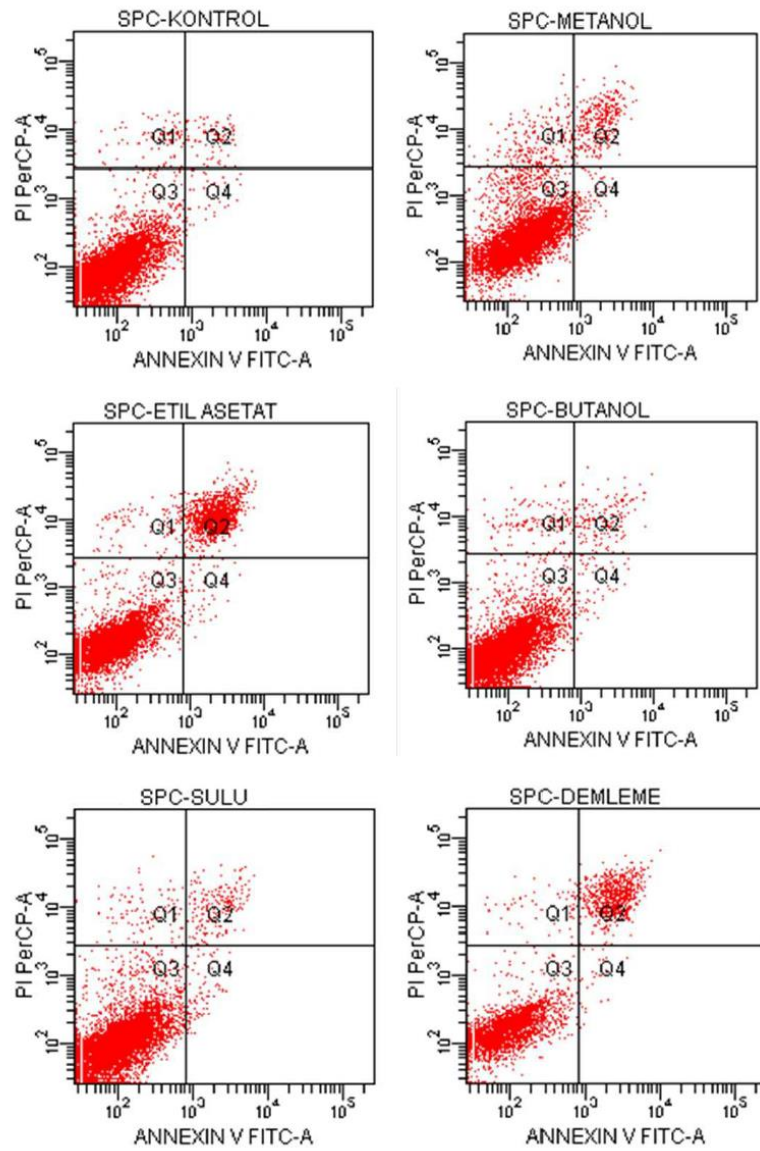
Etil asetat fraksiyonu uygulanmış SPC-212 hücrelerinde apoptoz oranı kontrole göre 2.5 kat artarak %1.4'lük bir apoptoz oranı sergilemiştir. Geç apoptoz/nekroz oranı ise 15.5 kat artarak %24.7 bulunmuştur. Bu artış son derece yüksektir ve A549'da da benzer bir oran belirlenmiştir. AO/EB deneylerinde de aynı dozda, %25 apoptoz indeksi gözlenmiştir.

Sulu fraksiyon uygulanan hücrelerde, kontrole göre 3 katlık artış ile %1.8 apoptoz oranı belirlenmiştir. Geç apoptotik/nekrotik hücreler yaklaşık 2 kat artmış ve %2.8 olarak tespit edilmiştir. Nekroz oranı yaklaşık 2.5 kat artarak %5.4 ölçülmüştür. A549 hücrelerde sulu fraksiyon çok yüksek bir dozda uygulanmış (IC₅₀ değeri) ve yüksek oranda apoptoz ve geç apoptoza sebep olmuştur. SPC-212 hücrelerde ise etkin IC₅₀ dozu son derece düşüktür ve hücre akış sitometresi çalışmasında apoptotik hücre oranındaki artış sadece 3 kat olmuştur. AO/EB deneylerinde de SPC-212 hücrelerinde,

aynı dozda uygulanan sulu fraksiyon % 26 oranında apoptoza sebep olmuştur.

5 mg/ml demlenmiş yeşil kahve uygulandığında, kontrole göre apoptoz oranı sadece 2 kat artmıştır. Ancak, geç apoptoz/geç nekroz oranı yaklaşık 20 kat artış göstermiştir. Nekroz oranı ise 1.5 kat artmıştır. Bu sonuçlar AO/EB deneyindeki sonuçlarla oldukça benzerdir. A549 hücrelerinde uygulanan demleme dozu 2 katı daha yüksektir bu nedenle de elde edilen apoptoz ve geç apoptoz oranları daha yüksektir.

AO/EB morfolojik incelemelerde geç apoptozun belirlendiği göz önüne alındığında, hücre akış sitometrisi çalışması ile AO/EB çalışmasının sonuçları birbirleriyle uyumludur.



Şekil 3.19. Yeşil kahve ekstresi ve fraksiyonlarının uygulandığı SPC-212 hücrelerinde annexin V-FITC/PI akım-sitometrik analizi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son zamanlarda canlılardan elde edilen bazı bileşenlerin tıp alanında kullanılması ilgi çekmektedir ve bir çok çalışmanın merkezinde yer almaktadır (Rancan, vd., 2002). Çalışmalarda kansere karşı koruyucu antioksidanlar, fenolik bileşenler ve koruyucu reaktif gruplar bulunmuştur (Reddy, vd., 2003).

Bu tez kapsamında yeşil kahvenin hem demlenmiş hali hemde metanol ekstresi ve metanol ekstresinden elde edilen butanol, etil asetat, sulu fraksiyonlarının A549 ve SPC-212 hücreleri üzerinde oluşturdıkları apoptotik etki çeşitli yöntemler ile araştırılmıştır.

4.1. A549 ve SPC-212 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Hücre canlılığını ölçmek için MTT ve NR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemlerde elde edilen sonuçlar canlılık ile doğru orantılıdır. Bu iki yöntem birbirinden farklı temellere dayanmaktadır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yeşil kahvenin A549 ve SPC-212 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri (mg/ml)

	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
mg/ml	MTT	MTT	MTT
A549			
KONTROL	100	100	100
Metanol	86.285	52.742	46.350
Etil asetat	62.487	50.429	42.203
N-butanol	57.950	49.349	38.377
Sulu	57.983	54.470	43.583
Demleme	59.076	49.010	27.211
SPC-212			
KONTROL	100	100	100
Metanol	60.041	49.834	44.449
Etil asetat	67.843	51.718	49.469
N-butanol	61.285	53.922	40.004
Sulu	59.062	54.621	48.259
Demleme	74.409	51.868	44.023

Demleniş yeşil kahve uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerini belirlemek için hem MTT hemde NR yöntemi kullanılmıştır. Hücre canlılıkları farklı aralıklarda tespit edilmesi yöntemlerin farklı temellere dayanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmada MTT yöntemi ile tespit edilen sitotoksik dozlar baz alınmıştır.

A549 ve SPC-212 hücrelerine aynı madde uygulanarak canlılık oranları göz önünde bulundurulduğunda; SPC-212 hücresinde A549 hücresine göre daha düşük

dozlarda IC_{50} değeri gözlenmiştir. Neticesinde SPC-212 hücrelerinin maddeye karşı daha hassas olduğu görülmektedir.

İlk aşamada yeşil kahvenin demlenmiş hali uygulanarak sitotoksik etkisinin varlığı belirlenmiştir. Wei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yeşil kahve ekstraktının NMR (nuclear magnetic resonance) vasıtasıyla kapsamlı şekilde analizi yapılmış, bu analiz ile 16 adet suda çözünebilen yeşil kahve bileşeni tanımlanmıştır (Wei ve Tanokura, 2014). Bu çalışmadan yola çıkarak bileşenlerin etkilerinin incelenmesi için bazı çözücüler kullanılarak fraksiyonlama yöntemi ile kabaca bir ayırım yapıldı. Bu yöntem de fraksiyonlama ile her bir çözücü belli maddeleri çekerek total karışımdan ayırdı. Bu fraksiyonların her biri hücreler üzerinde tek tek uygulandı. Bu uygulama sonucunda demlemede çok yüksek dozlarda IC_{50} görülürken fraksiyonlarda demlemeye göre daha düşük dozlarda IC_{50} değeri gözlemlendi. A549 ve SPC-212 hücrelerinde en etkili olan fraksiyonun etil asetat fraksiyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular göstermektedir ki: etil asetat ile toplanan madde içeriği ne ise bunun hücre ölümü üzerine etkisinin diğerlerine kıyasla daha fazla olduğudur.

4.2. A549 ve SPC-212 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik ve Morfolojik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Hücre morfolojisindeki değişim ve apoptotik indeksi belirlemek için AO/EB çift boyama yöntemi kullanılmıştır. Hücre membranında ve çekirdekte maddelerin etkisiyle oluşan değişimleri tespit etmek amacıyla kullanılan yöntemin temeli kullanılan boyaların özelliklerine dayanmaktadır. Akridin oranj boyası ile canlı ve ölü hücreler boyanırken, sadece membran bütünlüğü bozulmuş olan hücreleri etidyum bromür boyamaktadır (Gürbüz, V., vd., 2011; Ribble, D., vd., 2005; Avcı, Ç. B., vd., 2013).

A549 ve SPC-212 hücre hattında daha önce belirlenen IC_{50} değerleri, bu değerlerin bir alt dozu ve bir üst dozunda maddenin etkisiyle meydana gelen membran ve çekirdekteki değişimler AO/EB çift boyama yapılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda kullanılan tüm maddelerin her iki hücre hattı üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak bu etki her birinde farklı dozlarda görülmüştür. A549 hücresini %8.60 oranında apoptotik indeks gösteren kontrol grubunu baz alarak kendi içinde değerlendirirsek; IC_{50} dozlarına bakıldığında en yüksek apoptotik indeksi %36 oranında 10mg/ml dozunda demleme göstermiştir. Etil asetat fraksiyonu ise %34.53 apoptotik indeks oranı ile demlemeden hemen sonra gelmektedir. Fakat etil asetat fraksiyonu

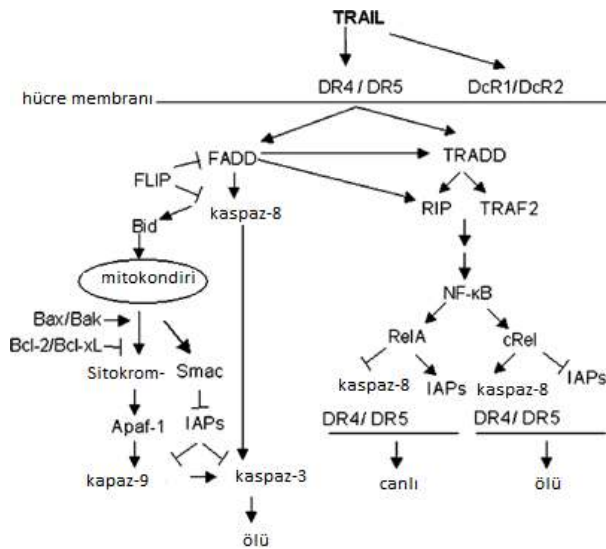
demlemeden daha düşük dozda etki gösterdiği için demlemeden daha etkin olduğu düşünülmektedir. SPC-212 hücrelerinde kontrol grubunda %5.40 oranının da apoptotik indeks belirlenmiştir. SPC-212 hücrelerinde kontrol grubuna göre en yüksek apoptotik indeks yüzdesini IC_{50} değerinde etil asetat fraksiyonunda tespit edilmiştir. IC_{50} değerinin üst dozuna bakıldığında ise demleme %35.60 ile en yüksek apoptotik indeksi göstermektedir. Bu sonuçlar demlemeye göre daha düşük dozlarda etkili olan etil asetat fraksiyonunun hücreleri apoptotik yola sürükleyen madde/maddelerin büyük bir kısmını içerdiğini göstermektedir.

Anneksin V/FITC ve PI boyamasından elde edilen sonuçlar incelendiğinde; A549 hücrelerinde; sadece PI ile boyalı hücrelerde (Q1 kadranı) kontrole göre en yüksek artış demlemede görülmektedir. Sadece Anneksin V ile boyanan hücrelerde (Q4 kadranında) ise kontrole göre demleme ve hemen ardından etil asetat dikkate değer etki göstermektedir. Her iki boya ile boyanan hücreleri ise Q2 kadranında görmekteyiz. A549 hücrelerinde kontrole göre Q2 kadranında en yüksek artış sırası ile demleme ve etil asetat fraksiyonlarında görülmektedir. Bu oranlar A549 hücrelerinde 48 saatte ve düşük dozda etil asetat fraksiyonunun etkisinin hücre zarında hasara yol açarak hücrenin iç yüzeyinde yerleşen fosfotidil serinlerin hücrenin dış yüzeyine taşınması ve hücre geçirgenliğine olan etkisinin diğer maddelere göre daha yüksek olduğunun ispatıdır. Q4 kadranında yani sadece anneksin ile boyanmış hücre popülasyonunun da artış olması hücrenin apoptotik sürece yeni başladığının kanıtıdır ancak, etil asetat fraksiyonu ve demlemede Q2 kadranında hücre popülasyonunda artış gözlenmesi hücrelerin geç apoptoz evresinde olduğunu göstermektedir. SPC-212’de PI ile boyanan hücrelerin oranlarına bakıldığında uygulanan maddeler arasında önemli bir fark olmadığı, ancak diğer maddelere göre sulu fraksiyonun etkili olduğunu görülmektedir. Etil asetat ve demlemede Q2 kadranında hücre popülasyonunda diğer maddelere oranla dikkate değer bir artış görülmektedir. Etil asetat demlemeye göre çok daha düşük dozlarda ve demlemenin Q2 kadranında belirlenen değere yakın bir etki gösterir, anneksin V ile boyanan hücrelerin yanı sıra PI ile boyanması yani Q2 kadranındaki artış hücrelerin geç apoptoz evresinde olduğunu göstermektedir.

Apoptotik sürecin başında hangi başlatıcı kaspaz enzimlerinin aktif olduğunu ya da apoptotik sürecin hangi yolak üzerinden çalıştığını belirlemek için ortamda hangi enzimin bulunduğunu tespit etmek önemlidir. Kaspaz aktivasyonun hücre içinde yapısal

ve biyokimyasal değişimler olmadan, hücre bleplenmeden önce başlamaktadır. Bu sebeple enzim aktivasyonunu IC_{50} 'nin alt dozunda araştırılmıştır. Enzim aktivasyonunu belirlemek için kaspaz kolorimetrik enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonuçları incelendiğinde A549 hücrelerinde kaspaz-8 ve kaspaz-9'un kontrol grubu birbirine çok yakın bir değer gösterir. Fakat kaspaz-8'in aktivasyonunun kaspaz-9'a göre daha çok arttığı gözlenmiştir. Özellikle etil asetat fraksiyonu ve demlemede bu artış diğer maddelere göre daha fazladır. SPC-212 hücresine bakıldığında A549 hücrelerine benzer şekilde etil asetat fraksiyonu ve demlemede kaspaz-8 aktivasyonu kaspaz-9 enzim aktivasyonuna göre yüksektir. Bu veriler kaspaz-8 enziminin her iki hücre de Şekil 4.1'de görülen apoptotik süreçlerden birini üstlendiğinin ispatıdır. A549 ve SPC-212 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyon değerlerinde kontrole göre artış görülmektedir. Başlatıcı kaspaz-8'den efektör kaspaz-3'e uzanan ve hücrelerde apoptotik sürecin varlığını bildiren bu enzimlerin tam olarak hangi yolu izlediği daha detaylı bir çalışma ile belirlenmesi gerekmektedir.

Her iki hücrede de Kaspaz-8'in aktivasyonunun artmış olması özellikle etil asetat fraksiyonun ve demlemenin ölüm reseptörü aracılı apoptoz uyarımı sağladığını düşündürmektedir. Şekil 4.1'de kaspaz-8'in kaspaz-9 ve kaspaz-3 ile olan bağlantısı görülmektedir.



Şekil 4.1. Kaspaz-8 enziminin apoptozdaki rolü.

Literatür taramasında yeşil kahvenin hücre ölümü üzerine olan etkisini araştırılması ile ilgili çalışmaların az olduğunu ve yapılan çalışmalarda yeşil kahve

bileşenleri saf olarak kullanıldığı görülmektedir.

Baeza ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HepG2 hücrelerine 400 μ M tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) ile inkübe edilerek oksidatif stres oluşturulmuş. Yeşil kahve çekirdeği ekstresinin ana bileşenlerinden olan; hydroxycinnamic asit, 5-CQA (5-caffeoylquinic acid), 3,5-DCQA (3,5-dicaffeoylquinic acid), CAF (methylxanthine caffeine)'ın farklı konsantrasyonlarının uygulanması HepG2 hücreleri tarafından üretilen ROS (reaktif oksijen türleri)'da önemli derecede azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Ayrıca t-BOOH tarafından sebep oluşan hücresel ve makromoleküler hasarı önlemiş ve deney gruplarında kontrole benzer değerlerde antioksidant enzim aktivitesi ve glutatyon seviyesi gözlenmiştir. İn vivo oksidatif strese karşı önemli derecede koruma sağlamıştır (Baeza, vd., 2014).

Kanimozhi ve Prasad' ın yaptığı çalışmada HeLa ve ME-80 hücrelerine Kafeik asit uygulayarak hücrelerde proliferasyonunun durduğu ve apoptozda önemli bir rolü olan mitokondirinin depolarizasyonunu arttırıp hücreyi apoptoza ittiğini tespit etmişlerdir. Kafeik asit ile tedavi sürecinde HeLa' da %91 ME-180' de %78 oranında ROS (reaktif oksijen türleri)'nin arttı gözlenmiştir. Bununda kafeik asidin pro-oksident özelliğinden dolayı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca GSH seviyesinin yüksek olması hücrelerin kemoterapik ajanlara direncini arttırdığı bilinir. Kafeik asidin uygulanması ile HeLa ve ME-180 hücrelerinde GSH seviyesini azaltmıştır. (Kanimozhi ve Prasad, 2015). Yapılan bu çalışmada 5-50 mg/ml aralığında dozlar kullanılmış ve 30 mg/ml de IC₅₀ değeri tespit edilmiştir. Daha düşük dozlarda etkinlik göstermesi maddenin saf halinin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bulgulara ve yapılan literatür araştırmasına dayanarak yeşil kahve ekstresi ve bileşenlerinin apoptotik süreci tetiklediği düşünülmektedir. Özellikle bazı fraksiyonlarda gözlenen kaspaz-8 aktivasyonundaki artış maddenin ölüm reseptörlerini tetiklediği ve iç sinyal yolağını başlattığı fikrini oluşturmaktadır. Çalışmada yapılan AO/EB çift boyama, Anneksin V/FITC ve kaspaz-8, -9, -3 enzim aktivasyonu yöntemleri ile elde edilen sonuçlar hipotezimizi desteklemektedir. Yapılan bu çalışma ileriki çalışmalara bir ışık olacaktır. Bu çalışmanın devamında etken maddenin ne olduğu ve hücre ölünme sebep olan sinyal yolunun daha detaylı araştırılması yapılacaktır. Etken maddenin belirlenmesi ve etkinliğinin artırılması ileride kanser tedavisi sürecine bir katkı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ağar, O. T., “Bazı *ACHILLEA L.* Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik Araştırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2010).
- Akkoçlu, A., Öztürk, C., “Akciğer Kanseri, Multidisipliner Yaklaşım”, *Toraks Kitapları No:1 Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara (1999).
- Akşit, H. ve Bildik, A., “Apoptozis,” *YYÜ Vet. Fak. Derg.*, 19 (1): 55–63 (2008).
- Alameda, J. P., Moreno-Maldonado, R., Navarro, M., et al., “An Inactivating CYLD Mutation Promotes Skin Tumor Progression by Conferring Enhanced Proliferative, Survival and Angiogenic Properties to Epidermal Cancer Cells”, *Oncogene*, 29: 6522–6532 (2010).
- Alavanja, M. C. R., “Biologic Damage Resulting From Exposure to Tobacco Smoke and from Radon: Implication for Preventive Interventions”, *Oncogene*, 21: 7365-7375 (2002).
- Alberg, A. J., Brock, M. V., Samet, J. M., “Epidemiology of Lung Cancer: Looking to the Future”, *Journal of Clinical Oncology*, 23: 3176-3186 (2005).
- Aliustaoğlu, M. 2009. Temel Kanser Fizyopatolojisi. http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/8.pdf (Erişim tarihi: 19.05.2014).
- Altıntaş, Z., Tothill, I., “Biomarkers and Biosensors for The Early Diagnosis of Lung Cancer”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 188: 988-998 (2013).
- Altunkanyak, B. Z. ve Özbek, E., “Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?”, *Tıp Araştırma Dergisi*, 6 (2): 93-104 (2008).
- Anand, P., Kunnumakara, A. P., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., Aggarwal B. B., “Cancer is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes”, *Pharmaceutical Research*, 25 (9): 2097-2116 (2008).
- Andera, L., “Signaling Activated by the Death Receptors of the TNFR Family”, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 80: 153-173 (2009).
- Arrifin, Z. S. H., Wan Omar, W. H. H., Zainal Arrifin, Z., Safian, M. F., Senafi, S. and Megat Abdul Whab, R., “Intrinsic Anticarcinogenic Effects of Piper Sarmmentosum Ethanolic Extract on a Human Hepatoma cell line”, *Cancer Cell International*, 13(4): 2867 (2009).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Avcı, Ç. B., Süslüer, Y. S., Şığva, D. Ö., Söğütlü, F., Dünder, M., ve Gündüz, C., “Rapamisinin Prostat Kanseri Hücre Hatlarındaki Etkisi”, *Ege Tıp Dergisi*, 52 (1): 7-14 (2013).
- Baeza, G., Amigo-Benavent, M., Sarriá, B., Goya, L., Mateos, R., Bravo, L., “Green Coffee Hydroxycinnamic Acids But Not Caffeine Protect Human Hepg2 Cells Against Oxidative Stress”, *Food Research International*, 62: 1038-1046 (2014).
- Baines, C. P., “Role of the Mitochondrion in Programmed Necrosis”, *Front Physiol*, 29 (1): 156 (2010).
- Başara, B., “Kersetin’in Malignant Mezotelyoma Hücre Döngüsü ve Hücre Ölümüne Etkisi” Yüksek Lisans Tezi, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze, (2006).
- Başaran, B., “Kersetin’in Malignant Mezotelyoma Hücre döngüsü ve Hücre Ölümüne Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gebze İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze (2006).
- Baytop, T., “Türkiye Bitkileri ile Tedavi Geçmişte ve Bugün 2. Baskı”, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul (1999).
- Bertrand, M. J., Milutinovic, S., Dickson, K. M., et al. “cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning As E3 Ligases That Promotes RIP1 Ubiquitination”, *Molecular Cell*, 30: 689–700 (2008).
- Bocchetta, M., Di Resta, I., Powers, A., Fresco, R., Tosolini, A., Testa, J. R., Pass, H. I., Rizzo, P., Carbone, M., “Human Mesothelial Cells are Unusually Susceptible to Simian Virus 40-Mediated Transformation and Asbestos Cocarcinogenicity”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (18): 10214–10219 (2000).
- Bocchetta, M., Elias, S., De Marco, M. A., Rudzinski, J., Zhang, L., Carbone, M., “The SV40 Large T Antigen-p53 Complexes Bind and Activate the Insulin-Like Growth Factor-I Promoter Stimulating Cell Growth”, *Cancer Res.*, 68 (4): 1022–1029 (2008).
- Bonne, C., “Morphological Resemblance of Pulmonary Adenomatosis (Jaagsiekte) in Sheep and Certain Cases of Cancer of the Lung in Man”, *Cancer Research*, 35: 491-501 (1939).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Bradbury, A. G. W., Halliday, D. J., “Chemical Structures of Green Coffee Bean Polysaccharides”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (2): 389-392 (1990).
- Briselli, M., Mark, E. J., “Dickerson GR. Solitary fibrous tumors of pleura”, Eight new cases and review of 360 Cases in the Literature, *Cancer* , 47: 2678-89 (1981).
- Butt, M. and Sultan, M., “Coffee and Its Consumption: Benefits and Risks”, *Critical Reviews In Food Science & Nutrition*, 51(4): 363-373 (2011).
- Caggia, S., “Transcription Factors Involved in the Genesis and Progresion of Cancer Differently Modulated by Transforming Growth Factor-Beta 3 (TGF- β 3) in Prostate Cell Lines”, *University of Catania*, İtalya, (2004).
- Cameron, R. and Feuer, G., “Incidence of Apoptosis and its Pathological and Biochemical Manifestations”, *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*, Ed: Cameron, R.G. and Feuer, G., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1-35 (2000).
- Carbone, M., Ly, B.H., Dodson, R.F., Pagona, I., Morris, P.T., Dogan, U.A., Gazdar, A.F., Pass, H.I., Yang,H., “Malignant Mesothelioma: Facts, Myths and Hypotheses”, *J. Cell Physiol*, 227 (1): 44–58 (2012).
- Carter, D., Eggleston, T. C., “Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Lower Respiratory Tract”, 2nd series (F.17). Washington, D. C., *AFIP*, 328-49 (1980).
- Chan, D. W. and Sell, S., “Tumor Markers. In: .Tietz Textbook of Clinical Chemistry” 2th Edition, Ed: Burtis, C. A. and Ashwood, E. R., W. B. *Soundes Company*, Philadelphia, 897-927 (1994).
- Chen, G., Goeddel, D., V., “TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway”, *Science*, 296 (5573): 1634-1634 (2002).
- Clark, W.H., Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., “ Tumour Progression and The Nature of Cancer”. *Br. J. Cancer*, 64: 631-644 (1991).
- Clifford, M. N., Kazi, T., “The İnfluence of Coffee Bean Maturity on The Content of Chlorogenic Acids, Caffeine and trigonelline”, *Food Chemistry*, 26 (1): 59-69 (2004).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Çağlarırnak, N., Ünal, K., “Yeşil Kahve Tanesinin (Coffea Arabica) Kavrulması Sırasında Temel Kimyasal Bileşenlerinde Oluşan Değişmeler”, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1: 37-49 (1997).
- Çavdar, T., Ekim, N., “Akciğer Kanseri Multidisipliner Yaklaşım”, *Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi* 1: 17-53 (1999).
- Çoşkun, G., Özgür, H., “Molecular Mechanism of Apoptosis and Necrosis”, *Archives Medical Review Journal*, 20 (3): 145-158 (2011).
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., et al., “Chemical inhibitor of Nonapoptotic Cell Death With Therapeutic Potential for Ischemic Brain Injury”, *Nature Chemical Biology*, 1: 112–119 (2005).
- Desmond, N., Carney, M. D., “Lung cancer – Time to Move on from Chemotherapy”, *The New England Journal of Medicine*, 346: 126-128 (2002).
- Dos Santos, M. D., Almeida, M.C., Lopes, N. P., De Souza, G. E. P., “Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid”, *Biological and pharmaceutical Bulletin*, 29: 2236-2240 (2006).
- Duke, R. C., “Methods of Analysing Chromatin Changes Accompanying Apoptosis of Target Cell in Killer Cell Assays”, *Methods in Molecular Biology*, 282: 43-66 (2004).
- Duran, M., “Kahve Etüdü”, *Dış Ticaret Araştırma Servisi*, (2004).
- Ekshyyan, O. and Aw, T. Y., “Apoptosis in Acute and Chronic Neurological Disorders”, *Frontiers in Bioscience*, 9: 1567-1576 (2004).
- Elegbede, F., “Boric Acid Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells”, Doktora Tezi, *Nevada Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Lasvegas, (2003).
- Elmore, S., “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicologic Pathology*, 35: 495–516 (2007).
- Engin, K. ve Özyardımcı, N., “Akciğer Kanseri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamaları”, *Avrupa Tıp Kitapçılık*, İstanbul (2001).
- Erdemir, A. D., “Şifalı Bitkiler, Doğal İlaçlarla Geleneksel Tedaviler”, *Alfa Yayınları*, İstanbul (2001).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O. A., Baltacı, D., Oktay, M. and Çolakoğlu, S., “Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması)”, *Düzce Tıp Dergisi*, 14 (2): 87–101 (2012).
- Evans, T. L., Lynch, T.J., “Lung Cancer”, *Oncologist*, 6: 407-414 (2001).
- Fang, B., Zhang, L., “Mechanisms of Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer”, *Cancer Gene Therapy*, 12: 228-237 (2005).
- Farber, E., “The Multi-Step Nature of Cancer Development”, *Cancer Research*, 44: 4217–4223 (1984).
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D., “Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008”, *International Journal of Cancer*, 127: 2893-2917 (2010).
- Ferrone, M., Molt, S. E., “Trastuzumab for The Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer”, *Ann Pharmacother*, 37: 1904-1908 (2003).
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L. ve Audus, K. L., “Characterization of The A549 Cell Line As a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism”, *Experimental cell research*, 243: 359-366 (1998).
- Fotakis, G. ve Timbrell, J. A., “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 (2006).
- Galluzi, L., Kroemer, G., “Necroptosis: A Specialized Pathway of Programed Necrosis”, *Cell*, 135: 1161-1163 (2008).
- Gandini, S., Raimondi, S., Gnagnarella, P., Dore, J. F., Maisonneuve, P., Testori, A., “Vitamin D and Skin Cancer: a Meta-Analysis”, *European journal of cancer*, 45: 634-641 (2009).
- Geromel, C., Ferreira, L. P., Guerreiro, S. M. C., Cavalari, A. A., Pot, D., Pereira, L. F. P., Leroy, T., Vieria, L. G. E., Mazzafera, P., Marraccini, P., “Biochemical and Genomic Analysis of Sucrose Metabolism During Coffee (*Coffea Arabiaca*) Fruit Development”, *Journal of Experimental Botany*, 57 (12): 3243-3258 (2006).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Amstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. Ve Parks, W. P., “In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Line Derived from a Series of Solid Tumors”, *Journal of The National Cancer Institute*, 51 (5): 1417-1423 (1973).
- Ginsberg, R. J., Voker, E. E., Rosenzweig, K., “Non - Small Lung Cancer”. Cancer: Principles and Practices of Oncology, DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. *Lippincott-Raven*, Philadelphi (2001).
- Golstein, P., Kroemer, G., “Cell Death by Necrosis: Towards a Molecular Definition. Trends”, *Trends in Biochemical Sciences*, 2: 37-43 (2007).
- Grütter, M. G., “Caspases: Key Players in Programmed Cell Death”, *Current Opinion in Structural Biology*, 10: 649-655 (2000).
- Gutiérrez, J. B., Salsamendi, A., “Fundamentos De Ciência Toxicológica” *Diaz de Santos, Madrid*, 155–177 (2001).
- Gül, H., “Betulinik Asit’in Anti-Proliferatif Özelliklerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gebze İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze (2014).
- Gürbüz, V., Yılmaz, A., Gökçe, Ö. ve Konaç, E., “İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında (HT29) Sisplatin’in Apoptotik Etkisi, *Marmara Medical Journal*, 24 (2): 100-105 (2011).
- Hadju, S. I., Village, W., “Much Overlook Cause of Lung Cancer”, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 41: 97-101 (2011).
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., “The Hallmarks of Cancer”, *Cell*, 100: 57–70 (2000).
- Harmsma, M., Schutte, B., Remaekers, F. C. S., “Serum Markers in Small Cell Lung Cancer; Opportunities for Improvement”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on cancer*, 1836: 255-272 (2013).
- Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C., “Toward the Primary Prevention of Cancer.” *Science Classic*, 24: 1131-1138 (1991).
- Hengartner, M. O., Ellis, R. E., Horvitz, H. R., “*Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* Protects Cells from Programmed Cell Death”, *Nature*, 356: 494-499 (1992).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R. J., Yuan, J., “Identification of a Molecular Signaling Network That Regulates a Cellular Necrotic Cell Death Pathway”, *Cell*, 135: 1311-1323 (2008).
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J., “Fas Triggers an Alternative, Caspase-8-Independent Cell Death Pathway Using the Kinase RIP as Effector Molecule”, *Nat. Immuno*, 1: 489–495 (2000).
- Ily, A. and Viani, R., “Espresso Coffee: Chemistry of Quality”, *Academic pres*, San Diego (1995).
- İçli, F., Akbulut, H., “Onkolojiye Giriş”, İç Hastalıkları, İlçin, G., Biberoğlu, K., Süleymanlar, G., *Güneş kitapevi*, 2007-2014 (2005).
- Jaiswal, R., Patras, M. A., Eravuchira, P. J., Kuhnert, N., “Profile and Characterization of the Chlorogenic Acids in Green Robusta Coffee Beans by LC-MS”: Identification of Seven New Classes of Compounds”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (15): 8722-8737 (2010).
- Jemal, A., Bray, M., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., “Global Cancer Statistics”, *A cancer journal for clinicians*, 61: 69-90 (2011).
- Kanimozhi, G., Prasad, N. R., “Anticancer Effect of Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells”, *Coffee In Health And Disease Prevention*, Victor R. Preedy, London, 656-661 (2015).
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R., “Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics”, *British Journal of Cancer*, 26: 239–57 (1972).
- Kockx, M. M., Muhring, J., Knaapen, M. W. M., De Meyer, G. R. Y., “RNA Synthesis And Splicing Interferes With DNA in Situ and Labeling Techniques Used to Detect Apoptosis”, *Am. J. Pathol.*, 152: 885 (1998).
- Kopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., Van Oers, N. H., “Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis”. *Blood.*, 84: 1415–1420. (1994)

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D., Courtois, G., “The Tumor Suppressor CYLD Negatively Regulates NF- κ B Signaling Pathway by Deubiquitination”, *Nature*, 424: 801–805 (2003).
- Krismann, M., Muller, K. M., Jaworska, M., Johnen, G., “Molecular Cytogenetic Differences Between Histological Subtypes of Malignant Mesotheliomas: DNA Cytometry and Comparative Genomic Hybridization of 90 Cases”, *J Pathol*, 197: 363-71 (2002).
- Kroczyńska, B., Cutrone, R., Bocchetta, M., Yang, H., Elmishad, A. G., Vacek, P., Ramos-Nino, M., Mossman, B. T., Pass, H. I., Carbone, M., Crocidolite Asbestos and SV40 are Cocarcinogens in Human Mesothelial Cells and in Causing Mesothelioma in Hamsters”, *Proc Natl Acad Sci, USA.*, 103 (38): 14128–14133 (2006).
- L’Abbé, K. A., Howe, G. R., Burch, J. D., Miller, A. B., Abbatt, J., Choi, W., Du, J., Feather, J., Gallagher, R., “Radon exposure, cigarette smoking, and Other Mining Experience in the Beaverlodge Uranium Miners Cohort”, *Health Physics journal*, 60: 489-495 (1991).
- Lammers, T., “Improving the Efficacy of Combined Modality Anticancer Therapy Using HPMa Copolymer-Based Nanomedicine Formulations,” *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 62: 203–230 (2010).
- Lango, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, J., Loscalzo, J., “Harrison’s Principles of Internal Medicine”, 18. Basım. American; McGraw-Hill, (2011).
- Lawen, A., “Apoptosis-an Introduction”, *BioEssays*, 25: 888-896 (2003).
- Li, Z., Sheng, M., “Caspases in Synaptic Plasticity”, *Molecular Brain*, 5: 15 (2012).
- Lieberman, J., Fan, Z., “Nuclear War: the Granzim A-bomb”, *Current Opinion Immunology*, 15: 553–559 (2003).
- Liu, Z., Cheng, M. and Cao, M. Z., “Potential Targets for Molecular Imaging of Apoptosis Resistance in Hepatocellular Carcinoma,” *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, 10: 2349-2355 (2010).
- Lutz, W., “Differences in Individual Susceptibility to Toxic Effects of Chemicals Determine the Dose-Response Relationship and Consequences of Setting Exposure Standards”, *Toxicol Lett*, 126: 155–158 (2002).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Majno, G., Joris, I., “Apoptosis, Oncosis, and Necrosis an Overview of Cell Death”, *American Journal of Pathology*, 146: 3–15 (1995).
- Martinez, J. D., Parker, M. T., Fultz, K. E., Ignatenko, N. A., Gerner, E. W., “Cancer-Related Genes: Molecular Biology of Cancer”, Editörler: Abraham, D. J., *John Wiley & Sons Inc*, Tuscon, Arizona, 21-26 (2003).
- Minamoto, T., Mai, M., Ronai, Z., “K-Rasmutation: Early Detection İnmolecular Diagnosis and Risk Assessment of Colorectal, Pancreas, and Lung Cancers-a Review” *Cancer Detect Prev*, 24: 1–12 (2000).
- Milano, M. T., “Benign Mesothelioma.In: J. Deslauriers and LK Lacquet (eds)”, Toracic Surgery: Management of Pleural Diseases Val: 6. St Louis: *The CV Mosby Comp*, 316-26 (1990).
- Muller, C., Hofmann, T., “Screening of Raw Coffee for Thiol Binding Site Precursors Using “In Bean” Model Roasting Experiments”, *Journual of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (7): 2623-2629 (2005).
- Naumov, G. N., Akslen, L. A., Folkman, J., “Landes Bioscience Spotlight on Cancer Cell Dormancy Role of Angiogenesis in Human Tumor Dormancy Animal models of the Angiogenic Switch”, *Cell Cycle*, 5 (16): 1779-1787 (2006).
- Nicotera, P., Bernassola, F., Melino, G., “Regulation of the Apoptosis-Necrosis Switch”, *Oncogene*, 23: 2757-2765 (2004).
- Ohshima, H., Tatemichi, M., Sawa, T., “Chemical Basis of İnflammation-İnduced Carcinogenesis”, *Arch Biochem Biophys* 417: 3–11 (2003).
- Ohshima, H., Tazawa, H., Sylla, Bs., Sawa, T., “Prevention of Human Cancer By Modulation of Chronic İnflammatory Processes” *Mutation Research*, 591: 110–122 (2005).
- Oktar, N., “K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-Yİ]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Thiazolyl Blue) ile Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Adana (2009).
- Oliveira, P. A., Colaço A., Chaves R., Guedes-Pinto H., De-La-Cruz L. F. P., Lopes C., “Chemical carcinogenesis”, *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79 (4): 593-616 (2007).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Hanen, C., “Early Features of Apoptosis Detected by Four Different Flow Cytometry Assays”, *Apoptosis*, 3: 115 (1998).
- Öztek, İ., “Plevral Mezotelyoma Patolojisi ve Değerlendirmede Yeni Yaklaşımlar The Pathology of Plevra/ Mesothelioma and Recent Approach in the Evaluation”, *Türkiye Ekopatoloji Dergisi*, 3 (3-4): 128-143 (1997).
- Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M., Williams, D. P., “The Role of Metabolic Activation in Drug-Induced Hepatotoxicity”, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45: 177–202 (2005).
- Parkin, D. M., “Global Cancer Statistics in the Year 2000”, *The Lancet Oncology*, 2: 533-543 (2001).
- Payne, S., “ ‘Smoke Like a Man, Die Like a Man ?’: A Review of the Relationship Between Gender, Sex and Lung Cancer”, *Social Science & Medicine*, 53: 1067-1080 (2001).
- Pecorino, L., “Molecular Biology of Cancer”, *Oxford University Press Inc.*, New York (2008).
- Player, A., Barrett, J. C., Kawasaki, E. S., “Laser Capture Microdissection, Microarrays and the Precise Definition of a Cancer Cell”, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4 (6): 831–840 (2004).
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., Gabai, V. L., “Necrosis: a Specific Form of Programmed Cell Death”, *Experimental Cell Research*, 283 (1): 1–16 (2003).
- Ramalakshmi, K. and Raghavan, B., “Caffeine in Coffee: Its Removal Why and How?”, *Critical Reviews in Food Science And Nutrition*, 39: 441-456 (1999).
- Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K., Fernandez, E., Hidalgo, M. E., Quihot, W., Rubio, C., Boehm, F., Piazena, H., Oltmanns, U., “Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 68:133-139 (2002).
- Rao, C. V., Desai, D., Kaul, B. P., Amin, S., Reddy, B. S., “Effect of Caffeic Acid Esters on Carcinogen-Induced Mutagenicity and Human Colon Adenocarcinoma cell Growth”, *Chemico-Biological Interaction*, 84 (39): 277-290 (1992).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Rastogi, R. P., Sinha, R., Sinha, R. P., “Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity”, *EXCLI Journal*, 8: 155-181 (2009).
- Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K. D., “Natural products for cancer prevention: a global perspective”, *Pharmacology&Therapeutics*, 99: 1-13 (2003).
- Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A. ve Shellman, Y. G., “A Simple Technique for Quantifying Apoptosis in 96-Well Plates”, *BMC Biotechnology*, 5-12 (2005).
- Rieger, P. T., “The Biology of Cancer Genetics”, *Seminars in oncology nursing*, 20: 145-154 (2004).
- Robinson, W., “Molecular Events in the Pathogenesis of Hepadnavirus – Associated Hepatocellular Carcinoma”, *Ann. Rev. Med.* 45: 297 (1994).
- Rogers, W. J., Bezard, G., Deshayes, A., Meyer, I., Petiard, V., Marracini, P., “Biochemical and Molecular characterization and Expression of the 11S-type Storage Protein from *Coffea arabica* Endosperm”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (4): 261-272 (1999a).
- Rogers, W. J., Michaux, S., Bastin, M., Bucheli, P., “Changes to the Content of Sugars, Sugar Alcohols, Myo-Inositol, Carboxylic Acids and Inorganic Anions in Developing Grains from Different Varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*Coffea arabica*) Coffees”, *Plant Science*, 149: 115-123 (1999b).
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M. and Venkatachalam, M. A., “Apoptosis: Definition, Mechanisms and Relevance to Disease”, *Am J. Med.*, 107: 489-506 (1999).
- Schittny, J. C., Djonov, V., Fine, A., Burri, P. H., “Programmed Cell Death Contributes to Postnatal Lung Development”, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 18: 786–793 (1998).
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Merkel, O., et al., “Inhibition of TNF Receptor 1 Internalization by Adenovirus 14.7K as a Novel Immune Escape Mechanism”, *Journal of Clinical Investigation*, 16: 2901–2913 (2006).
- Seggewiss, H., Minami, K., Korfer, R., “Localized Benign Mesothelioma of the Pleura: Case Report Anal Review of the Literature”, *Thorac Cardiovasc Surgeon*, 34: 330-32 (1986).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Solakoğlu, Z., “Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni”, *Klinik Gelişim*, 22 (3): 20–25 (2009).
- Stadler, R. H., Varga, N., Hau, J., Vera, F. A., Welte, D. H., “Alkylpyridiniums. 1. Formation in Model Systems via Thermal Degradation of Trigonelline”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1192-1199 (2002).
- Şar, S., “Kahvenin Sağlık ve Sosyal Yaşamımızdaki Yeri”, *Lokman Hekim Journal*, 2 (2): 35-44 (2012).
- Tas, F., Keskin, S., “Age-Specific Incidence Ratios of Lung Cancer (LC) in Turkey: LC in Older People is Increasing”, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 55: 276-278 (2011).
- Terzioğlu, G., Keskin, A. Ü. ve Demirel, G. Y., “Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması”, *Turkish Journal of Immunology*, 1 (3): 74-89 (2013).
- Tiainen, M., Rautonen, J., Pyrhonen, S., et al., “Chromosome Number Correlates with Survival in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma”, *Cancer Genet Cytogenet*, 62: 21–24 (1992).
- Trosko, J. E., “The Role of Stem Cells and Gap Junctional Intercellular Communication in Carcinogenesis”, *J Biochem Mol Biol*, 36: 43–48 (2003).
- Ulukaya, E., Acilan, C. and Yilmaz, Y., “Apoptosis: Why and How Does It Occur in Biology?”, *Cell Biochemistry and Function*, 29 (6): 468–80 (2011).
- Urbanik, T., Kohler, B. C., Boger, R. J., et al., “Down-Regulation of CYLD As A Trigger for NF- κ b Activation and a Mechanism of Apoptotic Resistance in Hepatocellular Carcinoma Cells”, *International Journal of Oncology*, 38: 121–131 (2011).
- Vatansever, B., “Prostat ve Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında *Rosmarinus officinalis L.* (Biberiye) Ekstresinin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması” Yüksek Lisans Tezi, *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bursa (2014).
- Velioglu, S., “Farklı Çay Ekstraktlarının Antioksidan, Antibakteriyal Etkileri ve Fenolik Madde Dağılımının HPLC ile Belirlenmesi”, *Ankara Üniversitesi, 2006-07-45-016-HPD*, (2007).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Ward, H. E. ve Nicholas, T. E., "Alveolar Type I and II Cells", *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 14: 731-734 (1984).
- Weaver, R. F., Hedrick, P. W., "Genes and Cancer", 3rd edition, *Brown Publishers* (1997).
- Wei, F. and Tanokura, M., "Organic Compound in Green Coffee Beans", *Coffeein Health and Disease Prevention* 1th ed., Victor Preedy, *Academic Press*, London, 150-161 (2014).
- Wei, F., Furihata, K., Hu, F., Miyakawa, T., Tanokura, M., "Complex Mixture Analysis of Organic Compounds in Green Coffee Bean Extract by Two Dimensional NMR Spectroscopy", *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48: 857-865 (2010).
- Wei, F., Furihata, K., Hu, F., Miyakawa, T., Tanokura, M., "Two-Dimensional ¹H–¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Comprehensive Analysis of Roasted Coffee Bean Extract", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (17): 9065-9073 (2011).
- Wei, F., Furihata, K., Koda, M., Hu, F., Kato, R., Miyakawa, T., Tanokura, M., "C-13 NMR-based Metabolimics for The Clasification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 10118-10125 (2012).
- Weinberg, R. A., "The Nature of Cancer," *The Biology of Cancer*, *Garland Science, Taylor&Francis Group*, LLC, United States of America (2007).
- Weyermann, J., Lochmann, D. ve Zimmer A., "A Practical Note on The Use of Cytotoxicity Assays", *International Journal of Pharmaceutics*, 288: 369-376 (2005).
- Winkler, V., Ott, J. J., Cowan, M., Becher, H., "Smoking Prevalence and Its Impacts on Lung Cancer Mortality in Sub-Saharan Africa: An Epidemiological Study", *Preventive Medicine*, 57: 634-640 (2013).
- Wu, W., Liu, P., Li, J., "Necroptosis: an Emerging Form of Programmed Cell Death", *Critical Reviews in Oncology/Hematoloji*, 82 (2012): 249-258 (2011).
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R., "Cell Death: the Significance of Apoptosis", *Int. Rev. Cyt*, 68: 251-306 (1980).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Xie, T., Peng, W., Liu, Y., Yan, C., Maki, J., Degterev, A., Yuan, A., Shi, Y., “Structural Basis of RIP1 Inhibition by Necrostatins”, *Structure*, 21: 493–499 (2013).
- Yaka, E., Eğrilmez, M. Y., Keskinoglu, P., Cavdar, Z., Genç, K., İyilikçi, L. ve Yener, G. G., “Alzheimer Hastalığında Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Biyolojik Belirteçler ve BOS’ un PC12 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine İn Vitro Etkisinin Değerlendirilmesi”, *Turkish Journal of Geriatrics*, 9 (1): 1-7 (2006).
- Yang, L., “Disfunction of The Apoptotic Pathway in Cancer Cells” Application of Apoptosis to Cancer Treatment, Ed: Mels Sluyser, *The Netherlands*, Amsterdam, 1-29 (2005).
- Yuan, J., “Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death”, *Journal of Cellular Biochemistry*, 60: 4–11 (1996).
- Zamani, A., Demir, C., Ak, G., Bayram, H., Batirel, S., Saygıdeğer, Y., “Patogenez”, Malign Plevral Mezotelyoma Türkiye Standartları Rehberi, Metintaş, M., *Türkiye Mezotelyoma Çalışma Grubu*, Eskişehir, 19-25 (2014).
- Zong, W. X., Thompson, C. B., “Necrotic Death As a Cell Fate”, *Genes & Development*, 20 (1): 1-15 (2006).
- Zur Hausen, H., “Molecular Pathogenesis of Cancer of The Cervix and Its Causation By Specific Papilloma Virus Type”, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 186: 131 (1994).
- <http://agscientific.com/blog/index.php/tag/necroptosis/> (25.12.2015).
- <http://dicionariosaude.com/necrose/> (25.12.2015).
- http://lts.yonsei.ac.kr/research/re_01.html (25.12.2015).
- <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/08/20100829-3.htm> (23. 01. 2016).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Tülin KORKMAZ
Doğum Yeri ve Tarihi : Kadıköy/ 1989



Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce
Bilimsel Faaliyetleri :

- Korkmaz T., Ergene E., 2015, Yeşil Kahve (GreenCoffe)'nin Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin İnsan Akciğer ve Mezateiyoma Hücre Hatlarında Belirlenmesi, 22. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 10-14 Ağustos 2015, Ankara Üniversitesi, Bildiri ve Poster Kitabı.
- Leblebici S., Korkmaz T., Kaygusuz Ö., Darcan C., 2014, Bazı Endemik Stachy Türlerine Ait Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Bildiri ve Poster Kitabı.
- Korkmaz T., 2011, Telomeraz Enzimi ve Aktivitesi, 18. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 4-9 Temmuz 2011, İstanbul Marmara Üniversitesi

İş Deneyimi

Stajlar : Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastahanesi,
2009-2010, "Mikrobiyoloji ve Biyokimya
Laboratuvarları" İSTANBUL.

İletişim

E-Posta Adresi : tulinkorkmaz89@gmail.com

Akademik Çalışmaları

- Darcan C., Kaygusuz Ö., Korkmaz T., 2013, Antimicrobial Effectiveness of [Cu(pzdc)(phen)₂]. 5.5H₂O Complex on Some Microorganisms, Journal of Pure and Applied Microbiology, 7(4), 2747-2756.
- Büyükkıdan N., Yenikaya C., İlkimen H., Karahan C., Darcan C., Korkmaz T., Süzen Y., 2015, Synthesis, Characterization and Biological Activites of Metal

(II) Dipicolinate Complexes Derived From Pyridine-2,6-Dicarboxylic Acid and 2-(Piperazin-1-yl)Ethanol, Journal of Molecular Structure, 1101, 139-146.