

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**7,12-DMBA UYGULANAN RATLARIN KARACİĞER
DOKUSUNDA BAZI APOPTOTİK MARKERLAR ÜZERİNE
LİKOPENİN ETKİLERİ**

Can Ali AĞCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ–2009

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**7,12-DMBA UYGULANAN RATLARIN KARACİĞER
DOKUSUNDA BAZI APOPTOTİK MARKERLAR ÜZERİNE
LİKOPENİN ETKİLERİ**

Can Ali AĞCA

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ–2009

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

7,12-DMBA UYGULANAN RATLARIN KARACİĞER
DOKUSUNDA BAZI APOPTOTİK MARKERLAR ÜZERİNE
LİKOPENİN ETKİLERİ

Can Ali AĞCA

Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 10/08/2009 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oy birliği ile başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Mehmet TUZCU
Üye : Prof.Dr. Kazım ŞAHİN
Üye : Doç.Dr. Ökkeş YILMAZ

İmza



Bu tez Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun....../....../.... tarih ve..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Mehmet TUZCU'ya teşekkür ederim.

Yaptığımız çalışmalar ve eğitimim esnasındaki katkılarından dolayı başta Bölüm Başkanımız Prof.Dr. Orhan ERMAN'a, Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof.Dr. Kazım ŞAHİN ve Doç.Dr. Nurhan ŞAHİN'e çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör. Abdullah ASLAN'a, Arş.Gör. Hasan GENÇOĞLU'na, Yrd.Doç.Dr. Fatih AKDEMİR'e, Arş.Gör. Cemal ORHAN'a, Yüksek lisans öğrencisi Ramazan GÜNDOĞDU'ya ayrıca ismi geçmeyen diğer arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında gerekli izinleri sağlayan personeli olduğum Bingöl Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tezime 1686 nolu proje ile katkı sağlayan FÜBAP birimi koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Arş. Gör. Can Ali AĞCA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER.....	I
ŞEKİLLER LİSTESİ	III
TABLOLAR LİSTESİ.....	IV
KISALTMALAR.....	V
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
1.GİRİŞ	1
1.1. 7,12-Dimetilbenzantrasen (DMBA)	1
1.2. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü).....	2
1.2.1 Ölüm Reseptörleri.....	3
1.2.2. Bcl-2 Ailesi Proteinleri	5
1.2.3. Mitokondrinin rolü ve Bcl-2 Ailesi'nin fonksiyonları.....	10
1.2.4.Kaspazlar.....	12
1.2.4.1. Kaspazların Aktivasyonu.....	14
1.3. Likopen.....	16
1.3.1. Likopenin Yapısı	16
1.3.2. Likopenin Antikanserojen Etkisi	17
1.3.2.1. Hücre Döngüsünü Durdurucu Etkisi	18
1.3.2.2. Haberleşmeyi Artırıcı Etkisi	18
1.3.2.3. IGF-1 Sinyal İletimini İnhibe Edici Etkisi.....	19
1.3.3. Likopenin Antioksidatif Etkisi.....	19
2. MATERYAL VE METOD	21
2.1. Hayvan Materyali	21
2.2. Deneme Düzeni.....	22
2.3. Örneklerin Alınması	22
2.4. Örneklerin Hazırlanması.....	22
2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi(SDS-PAGE)	23
2.5.1. Örneklerin SDS-PAGE ile Analizi	26
2.6. Western Blot.....	27

2.6.1 Örneklerin Western Blot ile Analizi	28
2.7. Örneklerde Malondialdehit (MDA) Analizi.....	30
2.8. Örneklerde Glutasyon (GSH) Analizi	30
2.9. İstatistiksel Analizler	32
3. BULGULAR	33
4.TARTIŞMA ve SONUÇ	39
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. TNF ve FAS aracılı ölüm yolağı.....	4
Şekil 2. Bcl-2 ailesi proteinlerinin şematik diyagramı	6
Şekil 3. Bax'ın aktivasyonu	7
Şekil 4. Bcl-2 protein ailesinin apoptozisteki işlevleri	9
Şekil 5. Bcl-2 protein ailesinin mitokondri üzerine etkisi	11
Şekil 6. Kaspaz'ın yapısı	12
Şekil 7. Kaspazların aktivasyonu	15
Şekil 8. Likopenin yapısı.....	16
Şekil 9. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda pro-apoptotik Bax ekspresyon düzeyleri.	33
Şekil 10. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyon düzeyleri	34
Şekil 11. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda aktif Kaspaz-9 ekspresyon düzeyleri. ..	35
Şekil 12. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda aktif Kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri. ..	36
Şekil 13. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda MDA düzeyleri	37
Şekil 14. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda GSH düzeyleri.....	38
Şekil 15. Likopen suplemanının DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusundaki apoptotik proteinler üzerine etkileri.....	43

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kaspazların sınıflandırılması	13
Tablo 2. Diyetin bileşimi.....	21

KISALTMALAR

$^1\text{O}_2$	: Singlet Oksijen
3-MC	: 3-Metilkolantren
DMBA	: 7,12-Dimetilbenzantrasen
AIF	: Apoptozis İndükleyici Faktör
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APS	: Amonyum persülfat
BaP	: Benzo[a]piren
BHT	: Butilat Hidroksitoluen
CARD	: Kaspaz güçlendirme alanı
CTL	: Sitotoksik T lenfositler
DAB	: Diaminobenzidin
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
DED	: Ölüm efektör bölgesi
DISC	: Ölüm uyarıcı sinyal kompleksi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
FasL	: Fas Ligand
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi
FÜHADEK	: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
GSH	: Redükte Glutasyon
GSHs	: Glutasyon S-transferazlar
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IGF-1	: Serum İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
kDa	: kiloDalton
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPO	: Lipit Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
NK	: Natural killer
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
SDS-PAGE	: SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	: Tetramethylethylenediamine

TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNF-R1	: TNF reseptörü-1
TNF-R2	: TNF reseptörü-2
TRADD	: TNF-R1 İle İlişkili �l�m Bölgesi
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluktaki Lipoprotein

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

7,12-DMBA UYGULANAN RATLARIN KARACİĞER DOKUSUNDA BAZI APOPTOTİK MARKERLAR ÜZERİNE LİKOPENİN ETKİLERİ

Can Ali AĞCA

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

2009, Sayfa: X+54

Likopen; domates, karpuz, greyfurt, guava gibi meyvelerde yüksek konsantrasyonda bulunan karotenoit bir bileşiktir. Likopenin tüketimi ile kanser riski arasında zıt bir ilişki vardır. Bu çalışma, Wistar albino ratlarda 7,12- Dimetilbenzantrasen (DMBA) ile oluşturulmuş karaciğer hasarında Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 ekspresyonları ile Malondialdehit (MDA) ve Glutasyon (GSH) düzeyleri üzerine likopenin etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Araştırmada 30 adet Wistar albino cinsi (8 haftalık, 180-200g) dişi rat kullanılmıştır. Ratlar, her grupta 10 adet rat (n=10) bulunacak şekilde Kontrol grubu, DMBA grubu, DMBA+Likopen grubu olarak rasgele üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu dışındaki ratlara 40 mg/kg/canlı ağırlık dozunda DMBA araştırmanın birinci ve 30. gününde intraperitoneal olarak uygulanmıştır. DMBA+Likopen grubuna 20 mg/kg/gün/canlı ağırlık dozunda likopen oral yolla uygulanmış ve uygulamaya 20 hafta süreyle devam edilmiştir.

Pro-apoptotik Bax ekspresyonunun, DMBA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azaldığı, DMBA+Likopen grubunda ise bu oranın kontrol grubuna yaklaştığı belirlenmiştir ($P<0.05$). Anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunun ise DMBA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla arttığını, DMBA+Likopen grubunda ise bu oranın kontrol grubuna yaklaştığı tespit edilmiştir ($P<0.05$). Aktif Kaspaz-9 ekspresyonunun, DMBA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azaldığı, DMBA+Likopen grubunda ise bu oranın kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür ($P<0.05$). Aktif Kaspaz-3 ekspresyonunun, DMBA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azaldığı, DMBA+Likopen grubunda ise bu oranın DMBA grubuna oranla arttığı tespit edilmiştir ($P<0.05$).

MDA düzeylerinin DMBA grubunda kontrol grubuna oranla daha fazla olduğu, DMBA+Likopen grubunda kontrole yaklaştığı tespit edilmiştir ($P<0.001$). GSH düzeylerinin DMBA grubunda kontrol grubuna oranla daha az olduğunu, DMBA+Likopen grubunda ise kontrole yaklaştığı tespit edilmiştir ($P<0.0001$).

Sonuç olarak, likopen suplemanının DMBA uygulanan ratların karaciğerinde anti-apoptotik Bcl-2'yi inhibe ettiği, pro-apoptotik Bax, aktif Kaspaz-9 ve aktif Kaspaz-3'ün ekspresyonlarını mitokondriyal hücre ölüm yolağını kullanarak artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca likopenin bu ratlarda MDA'yı azatdğı ve GSH arttırdğı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DMBA, Likopen, Karaciğer, Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, MDA, GSH

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECTS OF LYCOPENE ON SOME APOPTOTIC MARKERS IN LIVER TISSUES OF 7,12 DMBA APPLIED RATS

Can Ali AĞCA

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

2009, Page: X+54

Lycopene is a carotenoid compound found in certain fruit, such as tomato, watermelon, pink grapefruit and guava in high concentrations. Dietary intake of lycopene is inversely associated with the risk of cancer. The present study was conducted to decipher the effects of lycopene on the expression of Bax, Bcl-2, Caspase-9, Caspase-3 with Malondialdehyde (MDA) and Glutathione (GSH) concentration during 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene (DMBA)-induced liver damage in Wistar albino rats. In this study, 30 female Wistar albino rats (8 week, 180-220g) were used. Rats were separated randomly to three groups as Control group, DMBA group and DMBA+Lycopene group (n=10). Rats were intraperitoneally injected with DMBA (40 mg/ per kg) except control group. DMBA+Lycopene group daily administered with lycopene (20 mg/ per kg) by orally for 20 weeks.

Pro-apoptotic Bax expression was decreased in DMBA group compared to control, however it was close to control group in DMBA+Lycopene group ($P<0.05$). Anti apoptotic Bcl-2 expression was increased in DMBA group in comparison to control and in DMBA+Lycopene group this value was close to control group ($P<0.05$). Activated Caspase-9 expression was lower in DMBA group according to control group and in DMBA+Lycopene group this value was similar in control group ($P<0.05$). Similarly activated Caspase-3 expression decreased in DMBA group in comparison to controls and in DMBA+Lycopene group this expression became stronger according to DMBA group ($P<0.05$). Concentration of MDA was higher DMBA group, it was similar in DMBA+Lycopene and control groups ($P<0.001$). Concentration of GSH was lower DMBA group, it was similar in DMBA+Lycopene and control groups ($P<0.0001$).

In conclusion, lycopene supplementation may inhibit expression of Bcl-2 and may increase pro-apoptotic Bax, activated Caspase-3 and activated Caspase-9 expressions, used by mitochondrial cell death pathway in the liver of DMBA induced rats. Lycopene supplementation also may decrease MDA levels and increase GSH levels in rats.

Key Words: DMBA, Lycopene, Liver, Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9, MDA, GSH

1.GİRİŞ

1.1. 7,12-Dimetilbenzantrasen (DMBA)

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar doğada yaygın olarak bulunan kimyasal bir gruptur. Karbon ve hidrojen içeren organik maddelerin pirolizi veya tam olmayan yanmalar sonucu oluşan üç veya daha fazla aromatik halkalı bileşiklerdir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar deney hayvanları ve insanlarda kuvvetli karsinojenik potansiyele sahip maddelerdir. Son yıllarda gelişen moleküler biyoloji teknikleri ile polisiklik aromatik hidrokarbonların karsinojenik mekanizmalarının anlaşılmasında büyük bir ilerleme sağlanmıştır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar tümör başlatıcı, geliştirici ve ilerletici özellikleri olan potent karsinojenlerdir. Aynı zamanda deney hayvanlarında yapılan çalışmalarla bu maddelerin immün sistemi baskılayıcı oldukları gösterilmiştir. Karsinojenik potansiyellerinin yüksek oluşu da bu immünotoksik etkilerine bağlanmaktadır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar hem hücrel hem de humoral immüniteyi inhibe etmektedirler. Özellikle benzo[a]piren (BaP), 3-metilkolantren (3-MC) ve DMBA'nın, *in vivo* hayvan modellerinde ve insan periferik kan hücreleri ile yapılan *in vitro* testlerde çok yüksek derecede immünotoksik olduğu saptanmıştır [1]. Polisiklik aromatik hidrokarbonların ilk olarak 1921 yılında kanserojen oldukları belirlenmiştir. Karsinogenezin nasıl başladığını, biyomoleküllerle polisiklik aromatik hidrokarbonların etkileşim mekanizmasını açıklamak için birçok çalışmalar yapılmıştır. Polisiklik aromatik hidrokarbon ailesinin bir üyesi olan DMBA yüksek dozlarda kanseri başlatan ve devam ettiren bir kanserojendir. Dolaylı bir kanserojen olan DMBA'nın kanserojen hale gelebilmesi için metabolik aktivasyona ihtiyacı vardır. 7,12-dimetilbenzantrasen metabolizması sırasında oluşan reaktif oksijen türleri hücre içerisinde üretildiği yerden diğer hücrelere yayılabilir. Bu reaktif oksijen türlerinin lipid peroksidasyonunu başlatmasıyla zararlı sonuçlar ortaya çıkar. Bu nedenle DMBA uygulanmış hayvanlardaki hepatik lipid peroksidasyonundaki artış, reaktif oksijen türlerinin üretimini artırırken antioksidan mekanizmalarda bir azalmaya sebep olur [2,3]

7,12-dimetilbenzantrasen ratlarda meme kanserine neden olan polisiklik aromatik hidrokarbon olarak bilinir. Polisiklik aromatik hidrokarbondan DNA'ya diol epoksidlerinin kovalent bağlanmasının tümör başlangıcını tetiklediği kabul edilir. Bu nedenle diol epoksidlerini detoksifiye eden glutatyon S-transferazlar (GSHs) tarafından katalize edilen hücrel reaksiyonlar, tümör başlangıç riskini azaltmak için çok önemlidir. 7,12-dimetilbenzantrasen gibi polisiklik aromatik hidrokarbonların serbest radikalleri oluşturduğu ve karsinogenezde rol oynadığı görülmüştür. Bu

rol, DNA bağlarının kırılması ve lipid peroksidasyonu yoluyla hücresel oksidatif hasarı meydana getiren peroksitler, hidroksi ve süperoksit anyon radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin meydana getirilmesiyle desteklenmektedir. DNA ürünlerinin oluşumunun yanında DMBA'nın mutajen metabolizmadan kaynaklanan oksidatif ürünleri, protein ve lipid membranlarına zarar vererek hayati hücresel fonksiyonların yerine getirilmesine engel olur. Reaktif oksijen radikallerini süpürmek için hazır olan ve toksik oksidatif tehditlerden hücreleri koruyan vücut savunma sistemleri, çok sıklıkla doymuş hale gelip kusurlu olabilirler. Kusurlu antioksidan sistemler kansere ve ilaç toksisitesine hassasiyeti arttırmırlar. Bu nedenle diyetel antioksidan bileşikler ve mikrobelerin eklenmesi gibi uygun müdahaleler reaktif oksijen radikallerine bağılı hücresel hasara karşı korumada gerekli olabilir [4,5]. Deneysel karsinogenlerdeki en sık kullanılan model bileşiklerden biri DMBA'dır. 7,12-dimetilbenzantrazen, potansiyel mutajenik ve karsinogenik özelliklere sahiptir. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda DMBA'ya maruz bırakılan kemirgen modellerde ya da belirtilen mutajenik cevaplarda tümörlü hücre sayılarında belirgin bir artış olduğı gözlenmiştir [6].

1.2. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)

Aşırı hücre ölümü veya hücre ölümüne karşı olan direnç, hücresel homeostaziyi bozar ve organ fonksiyonlarını etkileyerek sonrasında organizmanın yaşamını etkiler [7]. Organizmada görevini tamamlamış ya da hasara uğramış hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen programlanmış hücre ölümüne apoptozis denir [8]. 1970'lere kadar bilinen tek hücre ölümü nekrozdu ve bu yüzden hücre ölümü fizyolojik olmayan zararlı bir olay gibi görünüyordu. İlk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972'de tanımlanan programlı hücre ölümü ya da diğeri adıyla apoptozis, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Buna göre bazı hücreler yıllarca yaşarken bazı hücreler ise sadece birkaç saat yaşayabilmektedir [9]. Her hücre doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi yani yapım ve yıkımın bir düzen içerisinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağılıdır. Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir. Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogeneğinde rol aldığı düşünülmektedir [10]. Apoptotik hücre ölüm programı; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve apoptotik proteaz aktive edici

faktör-1 (Apaf-1) olmak üzere üç ana bileşen içerir. Bu anahtar bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptoziste gözlenen morfolojik değişikliklerden, mitokondriyal hasardan, çekirdek zarı kırılmalarından, DNA fragmentasyonundan, kromatin kondansasyonundan ve apoptotik cisimciklerin şekillenmesinden sorumludur [9].

Apoptoziste bilinen iki yolak vardır. İntrinsik (içsel) yolak olarak da adlandırılan mitokondriyal yolak, hücre içinde oluşan sinyallere bağlı olarak başlar. Ekstrinsik (dışsal) yolda ise sinyal hücre dışından ölüm reseptör aracılığı ile başlar [7].

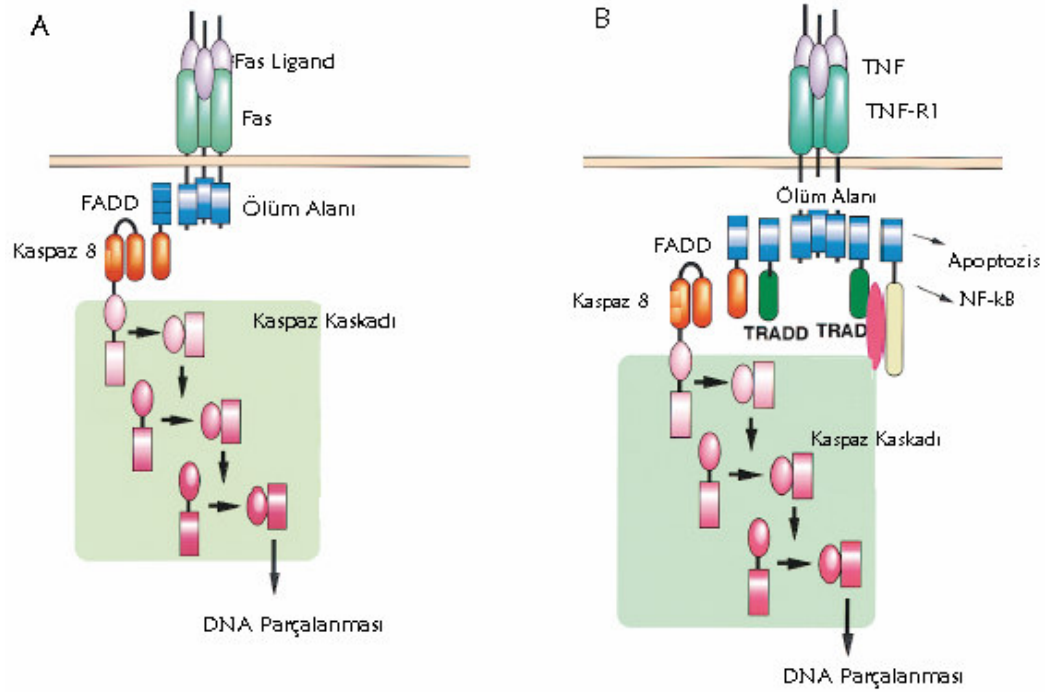
Apoptozisde hücreler nekrozisden farklı olarak tek tek etkilenir; hacimce küçülür, komşu hücrelerle teması kaybederler. Bu olay hızla gerçekleşirken aynı anda hücrede değişik yüzey çıkıntıları ve kıvrıntıları oluşur. Bunların membranla çevrili olarak hücreden ayrılmasıyla apoptotik cisimler meydana gelir. Mitokondriler, nekrozla ölen hücrelerin aksine başlangıçtan itibaren normal yapıdadırlar. Nekrozdan farklı olarak apoptozisde hücre zarı sağlamdır. Bu nedenle inflamasyona neden olmaz. Bütün önemli yapısal değişiklik çekirdekte başlayarak izlenir. Çekirdek zarının altında kromatin materyali yoğunlaşır ve kaba, büyük kümeler yapar. Buralarda nüklear porlar seçilemez. Çekirdek düzensizleşir ve ileri evrelerde nüklear parçalara bölünür. Çekirdekçiği genişler ve granülleri kaba kümeler halinde dağılır. Sitoplazmada açık renk vakuoller gelişir. Sonuçta membranla çevrili yuvarlak veya oval apoptotik cisimler meydana gelir. Oluşan bu apoptotik cisimler daha sonra komşu ve diğer hücreler tarafından fagosit edilir [11].

1.2.1 Ölüm Reseptörleri

Protein yapısında olan sitokinler, hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanmak suretiyle hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol etmektedirler. Yapısal özelliklerine göre üç gruba ayrılırlar. Bunlar; TNF (Tümör Nekroz Faktör), sitokin bağımlı büyüme faktörü ve helikal sitokinlerdir [12]. Ölüm reseptörleri; TNF reseptör gen ailesine aittir. Bilinen ölüm reseptörleri; Fas (APO-1/CD95), TNF-R1 (TNF reseptörü-1), TNF-R2 (TNF reseptörü-2), DR3 ve DR6 dır. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri Fas ve TNF-R1, karaciğer dokusunda fazla miktarda bulunur [13].

Önemli bir apoptotik faktör olan Fas Ligand (FasL), TNF ailesinin bir üyesidir [12]. FasL, apoptozisi başlatmak üzere hedef hücrede spesifik reseptörlere bağlanırlar (Şekil 1). FasL'ın reseptörü olan Fas, APO-1 veya CD-95 adıyla da bilinen bir tip-1 membran proteini [14, 15]. FasL, sitotoksik T lenfositlerde (CTL) ve natural killer (NK) hücrelerde bulunur [16, 17]. FasL, Tip-II membran proteini gibi N terminali sitoplazmada, C terminali ise ekstrasellüler alana doğru uzanmaktadır. Hedef hücrede bulunan reseptör FasL ile bağlandığında apoptozisi aktive eder.

Benzer şekilde, TNF ligand, reseptörleri TNF-R1 veya TNF-R2 ile bağlandığında apoptozisi aktive eder (Şekil 1). TNF-R1, pek çok dokuda bu sinyalin aktivasyonundan ve iletiminden sorumlu iken TNF-R2, timositlerde TNF bağımlı sinyalden sorumludur [16].



Şekil 1. TNF ve FAS aracılı ölüm yolağı [16]

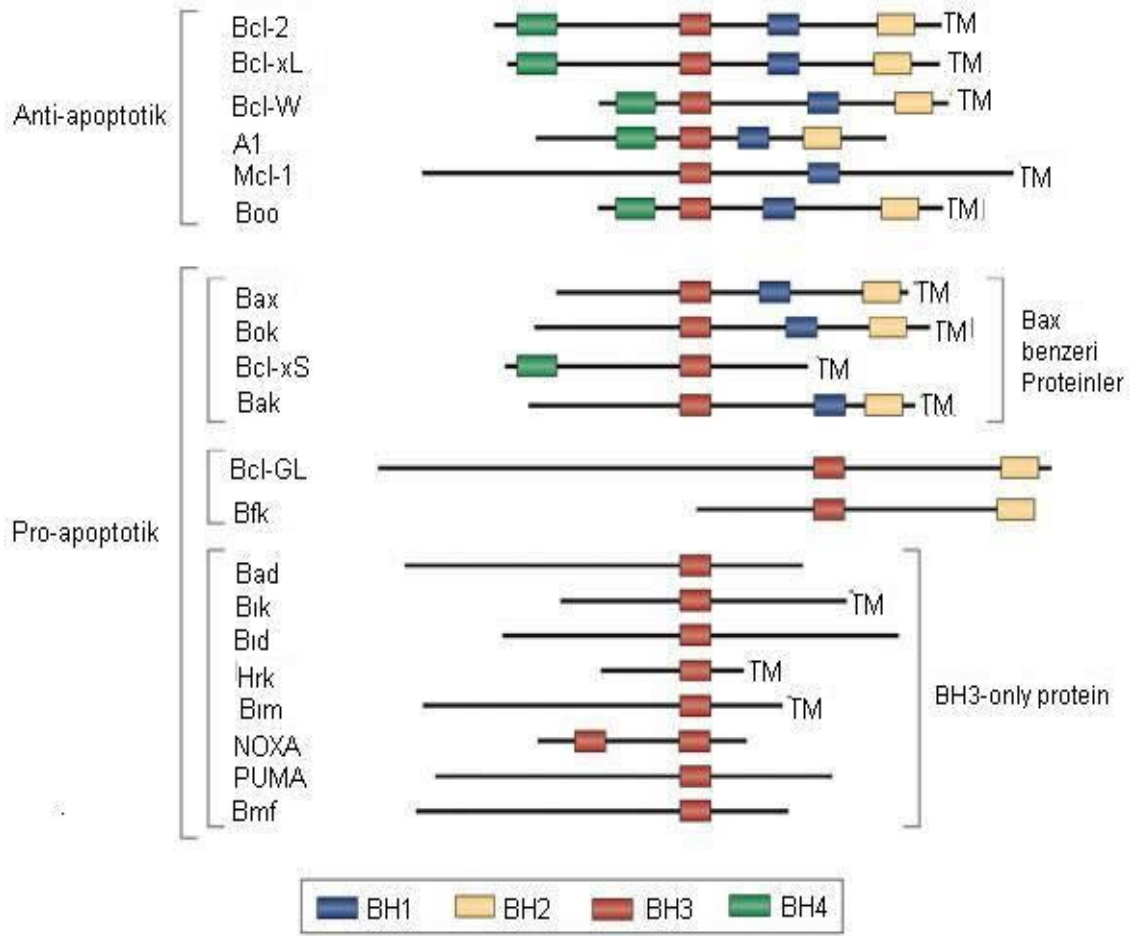
TNF-R1 ve Fas'ın sitoplazmik parçasında bulunan yaklaşık 80 aminoasitlik homolog bölgeler, ölüm sinyalinin iletimini sağladıklarından ölüm bölgeleri olarak adlandırılmışlardır. TNF, hedef hücredeki TNF-R1 ve TNF-R2 reseptörleri ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı adı verilen bir aminoasit dizisini içermektedir. Bu bölgeler, FADD (Fas İle İlişkili Ölüm Bölgesi) ve TRADD (TNF-R1 İle İlişkili Ölüm Bölgesi) olarak adlandırılır. TRADD, TNF-R1 ve TNF-R2 reseptörlerinin, FADD ise Fas reseptörünün ölüm bölgesidir [16]. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Membrana bağlı TNF ve FasL'ın metalloproteinaz enzimleri aracılığı ile proteolizi sonucunda membrandan ayrılıp serbest hale geçen formları mevcuttur. Bu serbest formlarına, solubl TNF ve solubl FasL adı verilmektedir [16,18-21]. Solubl formda bulunan TNF ve FasL'da apoptozisi aktive etmektedir. Ancak membrana bağlı TNF ve FasL'ın, spesifik reseptörlerini aktive etmekte solubl formlarından daha etkili oldukları saptanmıştır. Sonuç olarak

apoptozis FasL veya TNF ligandın hedef hücredeki ilgili reseptörleri ile bağlanması ile tetiklenir. Ölüm sinyali bundan sonraki aşamada bu ölüm bölgeleri üzerinden hücre çekirdeğine kadar ileti kaskadı aracılığı ile iletilir [16,17].

1.2.2. Bcl-2 Ailesi Proteinleri

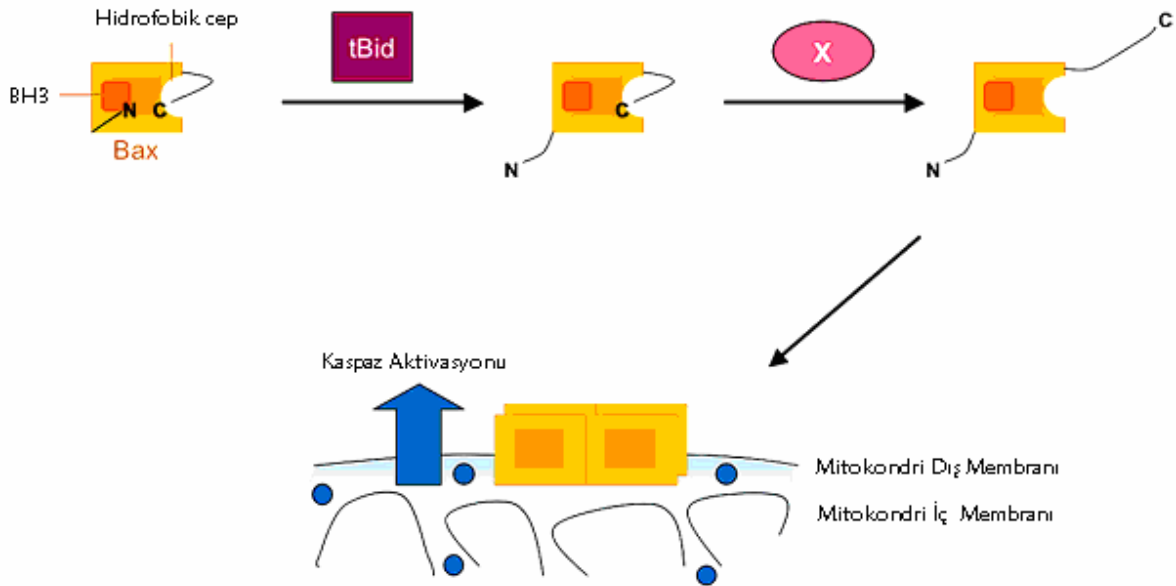
Hücre ölüm yolağında, apoptozisin hücre içi kritik kontrol noktasını Bcl-2 protein ailesi oluşturmaktadır. Bcl-2 ailesi, aile üyesi proteinlerin kendi aralarında ve mitokondri membran bütünlüğünü sağlayan diğer proteinler ile çeşitli etkileşimler sağlayarak apoptozisi düzenleyen geniş bir gruptur. Son araştırmalar Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenen apoptozis mekanizması üzerine yoğunlaşmıştır [22-24]. Aile üyesi proteinlerin birçoğu bir hastalık durumundan ötürü tanımlanmıştır ve bu yüzden ilk olarak onkogenlerin hücre sel çoğalmayı artırması bakımından benzer nitelikler taşıdığı düşünülmüştür [25-28]. Daha sonraları Bcl-2 nin hücre çoğalmasını tetiklemesinden çok hücre ölümünü engelleyici fonksiyonları keşfedilmiştir [29,30]. Bcl-2 protein ailesi hücre ölümünü engellemesi ile neoplastik gelişime izin veren bir onkogen sınıfıdır. Ailenin ilk üyesi olan “Bcl-2” B-hücre lenfomasında tanımlandığından bu adı almıştır. Bcl-2 proteinin memeli hücrelerinde keşfinden sonra Bcl-2 ailesinin 20 ye yakın üyesi tanımlanmıştır [31](Şekil 2).

Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi bazı üyeleri apoptozisi baskılar iken pro-apoptotik Bax ve Bak gibi üyeleri ise apoptozisi etkinleştirmektedir. Bax ve Bak gibi proapoptotik üyelerin aktivasyonu sitokrom-c nin mitokondriden hücreye geçişini uyarır iken Bcl-2 gibi anti-apoptotik üyeler ise bu durumu baskılamaktadır. Bcl-2 ailesi üyeleri, pro apoptotik Bax ve Bak uyarısı ile geçirgen mitokondriyal dış membranın sitokrom-c ve diğer proteinlerin salınması, dolayısıyla kaspazların aktivasyonunu ve hücre yıkımını uyarmaktadır [32].



Şekil 2. Bcl-2 ailesi proteinlerinin şematik diyagramı [33]

Hücrelerde çoklu-domaine sahip proapoptotik Bax ve Bak monomer olarak bulunmaktadır. İnaktif Bax ya sitoplazmada ya da zayıf bir biçimde membrana bağlı olarak bulunur ve bu proteinin hidrofobik cebi C-terminalindeki heliks ile doldurulmuş durumdadır. Ölüm sinyali alındığında Bax homodimerize olur ve mitokondri dış membranına girer. Mitokondride konuşlanmış olan inaktif Bak bu ölüm sinyaline yanıt verirken yapısal değişim geçirir, dimerize olur ve aktivite kazanır. Böylece mitokondri dış membranı geçirgen bir yapı kazanır. Bu geçirgenlik sitokrom-c yi de kapsayan diğer membran boşluk proteinlerinin salınmasına olanak verir [31].



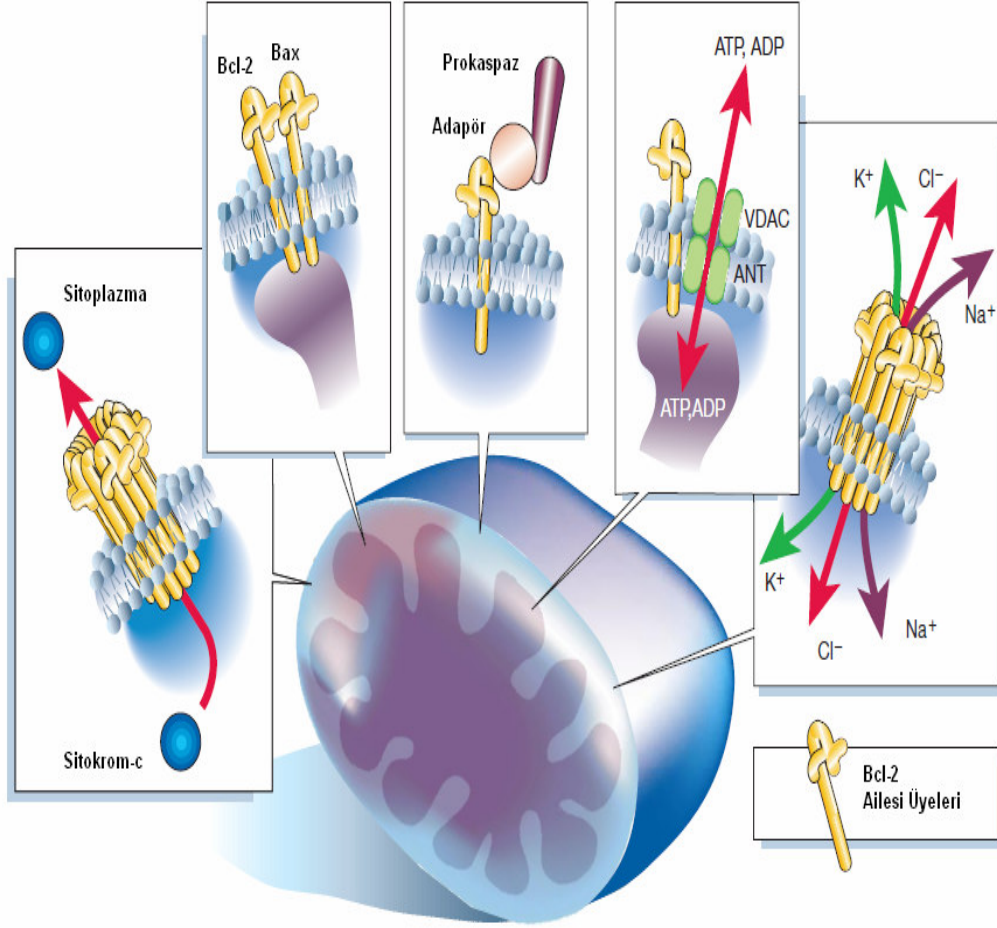
Şekil 3. Bax'ın aktivasyonu [34]

Bax sitoplazmada diğer faktörlere bağlı ve inaktif formda bulunur. Sinyaller alındığında Bax ve Bak'ın yapısı değişir. Bu proteinlerin N-terminal kısımları proteinin içerisine gömülü olarak bulunur sinyal alımıyla beraber hedef hale gelir (Şekil 4). Bax mitokondri membranına transloke olduktan sonra dış mitokondri membranına entegre olur. Bu sırada Bax ve Bak oligomerize olur ve mitokondri dış membranını geçirgen hale getirirler [34]. Geçirgen hale gelen mitokondri membranından Sitokrom-c salındığında sitoplazmadaki APAF-1 ile bağlanarak Kaspaz-9'un aktivasyonu ile apoptozom yapısı oluşur [35].

Bcl-2 proteini apoptozis esnasında; pro-apoptotik aile üyelerine bağlanarak onların inhibisyonu, mitokondri membranındaki iyon akışı ve sitokrom-c salınımı gibi birçok işlevi düzenlemektedir. Bütün aile üyeleri tarafından düzenlenen tek bir mekanizma yoktur ancak Bcl-2 ailesinin hem pro- hem de anti-apoptotik üyelerinin düzenlediği çeşitli mekanizmalar vardır. Hem pro- hem de anti-apoptotik üyeler ve onların birbirleri ile etkileşimleri diğer proteinlerin fonksiyonlarını nötralize edebilir. Bu durum hassas dengenin sürdürülmesini sağlar. Ancak pro ya da anti-apoptotik üyelerin ekspresyon düzeylerindeki değişim, hücrenin yaşamla ölüm arasındaki dengesini etkilemektedir. Bunun sonucunda aile üyelerinin dimerizasyonu, onların bireysel aktivitelerinde anahtar rol oynamaktadır. Örneğin; Bcl-2 ve Bcl-xL Bax'ın aktivitesini nötralize etmek için onunla eşleşebilme yeteneğine sahiptir. Bax normalde sitoplazmada monomer olarak bulunur fakat apoptotik sinyal bu proteinin Bax/Bax homodimeri şeklinde sitoplazmada

çoğalmasına neden olur. Homodimer konumuna geçen Bax daha sonra mitokondriye transloke olmaktadır [36, 37]. Bax'ın yapısındaki bu konformasyonel değişimin temel nedeninin pH ta meydana gelen değişimler ile olacağı iddia edilmiştir. Bu teori; apoptozisi önlemek ya da başlatmak için Bcl-2 aile üyeleri ile diğerlerinin nasıl etkileştiğini gösterirken, bireysel proteinler tarafından apoptozis'in moleküler düzeyde başlatılması tam olarak açıklanamamıştır. Böylesi bir hipotez, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik ve Bax gibi pro-apoptotik üyelerin lipid membranındaki iletken iyon kanallarını tıpkı mitokondri membranında Ca^{2+} , K^{+} ve Cl^{-} gibi iyonların değişimine neden oldukları gibi şekillendirebilmesiyle açıklanır. Bu değişimler apoptozise has olan mitokondrinin şişmesi gibi mitokondriyal anormalliklere neden olabilir. Bu yol sayesinde, aile üyelerinin ekspresyon düzeyleri apoptozisin başlangıcını düzenleyebilirler. Eğer hücredeki Bcl-2'nin ekspresyon düzeyi Bax 'ın düzeyinden daha fazla ise hücre apoptozisden kaçınır. Fakat hücredeki Bax'ın ekspresyon düzeyi Bcl-2 den daha fazla ise hücre apoptozise yönelir [24].

Apoptozisin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir diğer olay ise pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin fosforilasyonudur. Örneğin, Bad fosforile olmadığı durumda iken Bcl-2 ve Bcl-xL'i dimerize edebilir ve böylece onların anti apoptotik aktivitelerini Bax'ın homadimerize olmasını sağlayarak nötralize eder. Bununla birlikte fosforile durumda iken 14-3-3 proteini ile ayrılmıştır ve apoptozis etkileşimi sağlanamayarak Bcl-2 ve Bcl-xL tarafından inhibe edilemez. Yani pro-apoptotik rolü baskılanmaktadır [38].



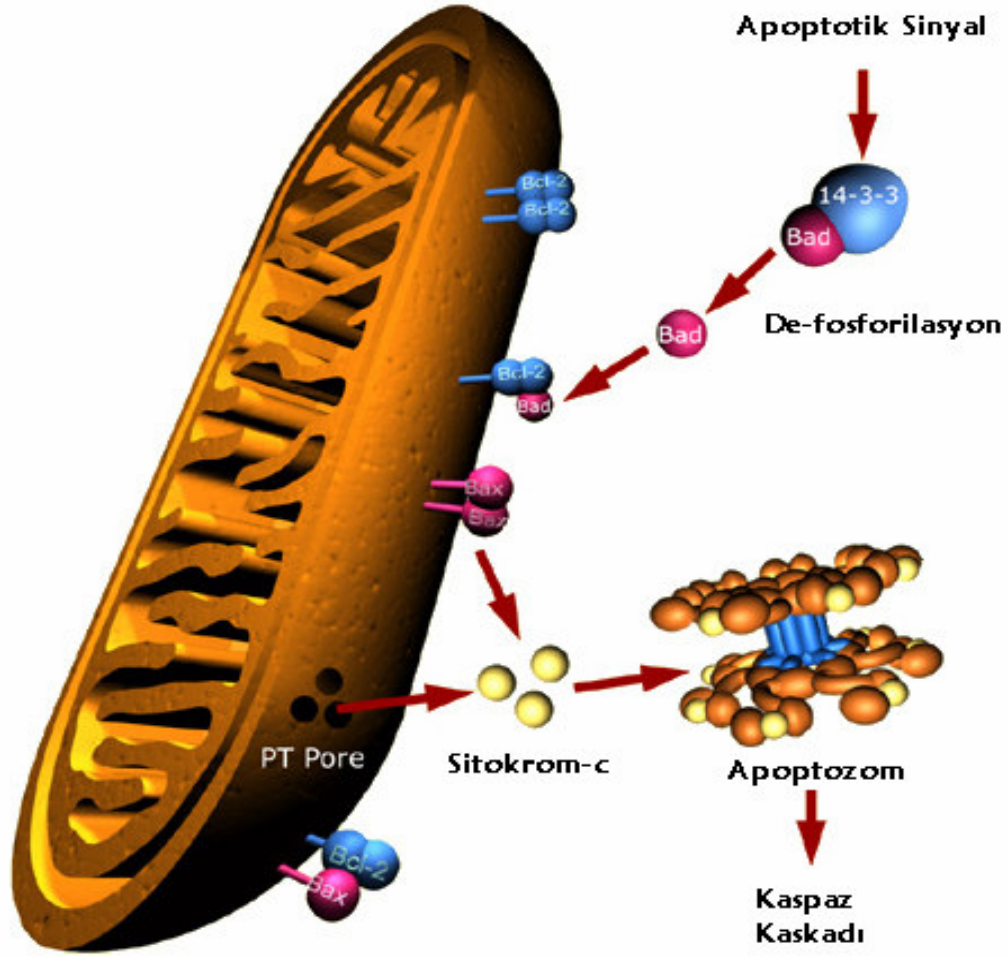
Şekil 4. Bcl-2 protein ailesinin apoptozisteki işlevleri [39]

Bcl-2 protein ailesinin apoptozisteki işlevlerini sıralayacak olursak;

- Mitokondri membranında por oluşumu sağlayarak sitokrom-c ve diğer proteinlerinin salınmasına aracılık eder.
- Pro ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasında heterodimer oluşumunu sağlar.
- Kaspazların düzenlenmesini sağlar.
- Mitokondrideki mevcut diğer proteinler ile etkileşimi sağlar. Bu etkileşimler por oluşturarak sitokrom-c salınımını veya mitokondri homeostasisidir.
- Zayıf seçici iyon kanalı oluştururlar [39] (Şekil 5).

1.2.3. Mitokondrinin rolü ve Bcl-2 Ailesi'nin fonksiyonları

Mitokondri, hücre ölümünün (apoptozis) kontrol edilmesinde önemli bir role sahiptir. Hücrenin iki ana ölüm yolağından biri olan içsel yolak, mitokondri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Mitokondri; AIF (Apoptozis İndükleyici Faktör), sitokrom-c gibi birçok pro-apoptotik proteini içermektedir. Bu faktörler mitokondriyal membranlardan salınırlar. Mitokondri membranında bulunan porların, hücre stresi, serbest radikal hasarı ya da büyüme faktörü yoksunluğu gibi apoptotik sinyal tarafından başlatılan ve pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyelerinin aktivasyonu boyunca biçimlendiği düşünülmektedir. Mitokondri aynı zamanda ölüm reseptöründen gelen apoptotik sinyalin Bcl-2 protein ailesi vasıtasıyla artırılmasında önemli rol oynamaktadır [40]. Apoptozisin bütün yolları kaspazların aktivasyonunda birleşir ve proteazlar, hücrelerin yıkımında inflamasyona neden olmadan ve etkin bir şekilde organize olurlar. Kaspazların aktivasyonuna öncülük eden iki ana yolak vardır. Bunlardan birincisi doğrudan kaspaz-8 aktivasyonuna öncülük eden ve hücre yüzeyi reseptörleri vasıtasıyla başlatılan dışsal yolaktır. İkincisi ise mitokondrinin aracılık ettiği içsel yolaktır. Apoptozis kontrolünün mitokondriyal aşaması kaspaz aktivasyonu ile değil Bcl-2 protein ailesi aracılığı ile yürütülür. Kaspaz aktivasyonunda mitokondrinin bilinen rolü; mitokondriyal membrandan sitoplazmaya sitokrom-c ve Apaf-1 gibi kaspazları aktifleştirici proteinlerin salınımını düzenlemektir (Şekil 2). Sitokrom-c mitokondriden salındığında sitoplazmadaki Apaf-1 ile bağlanarak kaspaz-9'un da aktivasyonu ile apoptozom yapısı oluşur [35].



Şekil 5. Bcl-2 protein ailesinin mitokondri üzerine etkisi [41]

Mitokondriden salınan diğer proteinlerde kaspazların aktivasyonunda çok önemli role sahiptir, belkide bu önem hücrelerin uzun süre yaşamalarında etkilidir [42]. Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal membran boyunca sitokrom-c ve diğer proteinlerin salınımını düzenler [43]. Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal hasarda; mitokondriye ait porların açılması ve apoptogenik proteinlerin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını düzenler. Apoptosis tetiklendiğinde mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c ve apoptozis uyarıcı faktör (AIF) salınır. Hem sitokrom-c hem de AIF Kaspazlar olarak ta adlandırılan hücre içindeki sisten proteazları aktifleştirmede geniş bir etkiye sahiptirler [44].

1.2.4.Kaspazlar

Kaspazlar spesifik substrat bölgesine sahip olan ve hedef proteinleri aspartik asit bölgesinden sonra kesen hücre içi sistein proteazlarıdır (C-Asp-ase; C: sistein amino asiti simgesi, Asp: aspartik asit, -ase: kesici enzim eki) [45]. Sağlıklı hücrelerde kaspaz molekülleri çoğunlukla, pro-Kaspaz olarak adlandırılan, monomerik zimojen halde bulunmaktadır. İnaktif haldeki pro-Kaspaz enzimleri apoptozis sinyalinin alınmasıyla birlikte diğer kaspazlar tarafından aspartik asit biriminden kesilerek aktive edilirler. Aktive olan kaspaz diğer kaspazları keserek inaktif formdan aktif forma dönüştürülür [46]. Kaspaz enzimleri büyük ve küçük olmak üzere iki alt birimden oluşur ve enzimin N-terminalinde pro-domain bölgesi bulunur. Enzimin büyük ve küçük alt birimleri birbirleriyle etkileşerek enzimin aktif merkezini oluştururlar ve bu aktif merkezde ise sistein amino asit'i yer alır . Kaspaz enzimlerinin pro-domainleri çeşitlilik gösterir; CARD (Kaspaz Güçlendirme Alanı) ve DED (Ölüm Efektör Bölgesi) enzimin pro- domaininde bulunan özel motiflerdir ve protein-protein etkileşiminde görev alırlar. Kristalografi çalışmaları, iki tane heterodimerin bir araya gelerek tetramer yapıda aktif kaspaz enzimini oluşturduğunu ortaya koymuştur [47,48]. Hücre içi ve hücre dışı birçok sinyal, apoptozis boyunca kaspazların başlatıcı ve etkin olarak ayrılan her iki sınıfının da aktivasyonunu düzenlediği bilinir. Apoptozis esnasında proteolitik olarak aktive olan kaspazların tümü aslında inaktif zimojen (pro-Kaspaz) olarak üretilir. Başlatıcı kaspazlar -2, -8, -9 ve -10, multiprotein-komplekslerdeki pro-domainin güçlendirilmesinden sonra otokatalitik aktivasyonla aktifleşirler, etkin kaspazlar pro-Kaspaz-3, -6, ve -7 ise başlatıcı kaspazlar tarafından aktifleştirilirler [31].



Şekil 6. Kaspaz'ın yapısı [45]

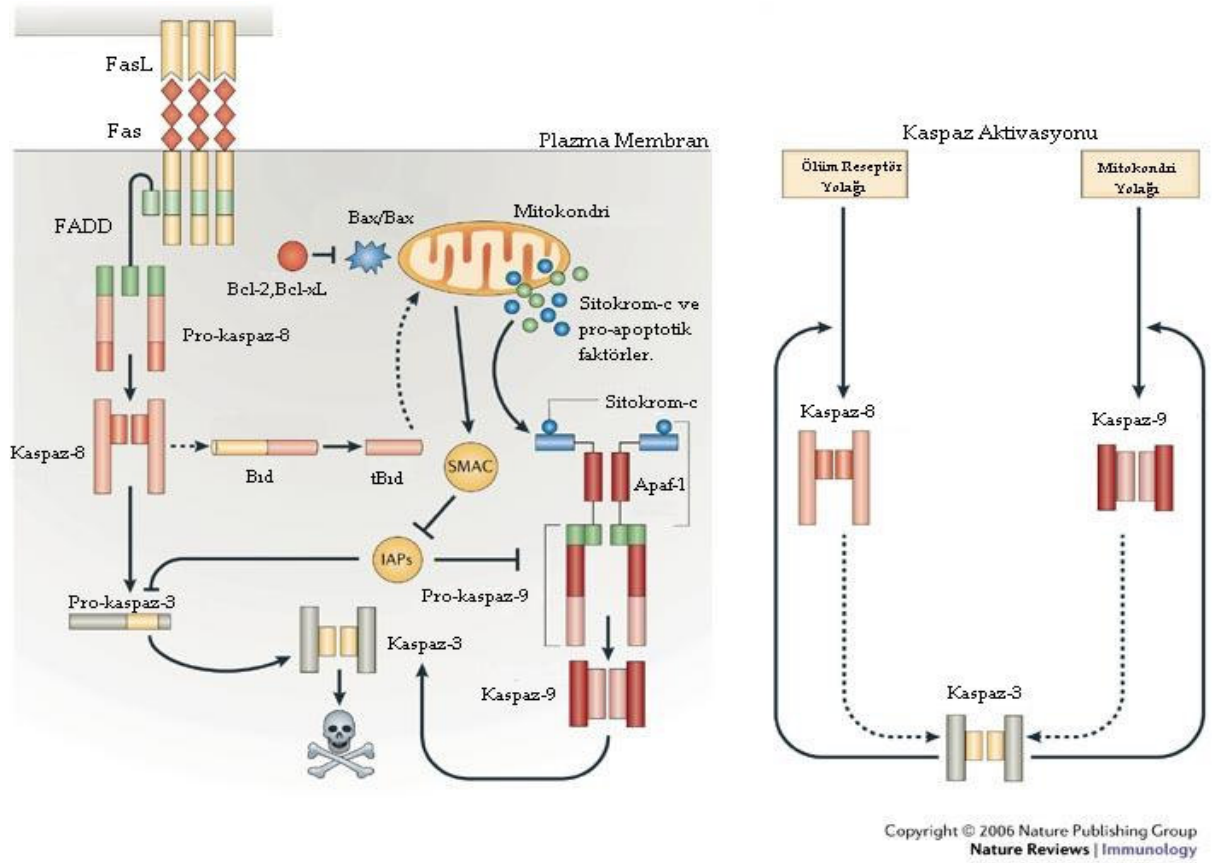
Tablo 1. Kaspazların sınıflandırılması

Kaspaz	Domain	Düzenleyici	İşlev
Başlatıcı Kaspazlar			
Kaspaz -2	CARD	RAIDD RIP TRADD	Sinir ve B- hücrelerinde apoptozisi başlatma.
Kaspaz -8	DED	FADD FLIP	Ölüm reseptörleri aracılığı ile apoptozisi başlatma.
Kaspaz -9	CARD	APAF-1 IAPs DIABLO HtrA2	Apoptozis
Kaspaz -10	DED	FADD FLIP	Ölüm reseptörleri aracılığı ile apoptozisi başlatma.
Etkin Kaspazlar			
Kaspaz -3	-	Kaspaz-9 IAPs DIABLO HtrA2	Apoptozis
Kaspaz -6	-	Kaspaz-3 ?	Kromatin kondenzasyonu, apoptotik cisimcikler.
Kaspaz -7	-	Kaspaz-9 IAPs DIABLO HtrA2	Bilinmiyor
Kaspaz -14	-	-	Bilinmiyor
Sitokin Kaspazlar			
Kaspaz -1	CARD	ASC Ipaf	İnflamasyon
Kaspaz -4	CARD	Kaspaz-8	İnflamasyon
Kaspaz -5	CARD		İnflamasyon
Kaspaz -11	CARD		İnflamasyon
Kaspaz -12	-	Kaspaz-8	Bilinmiyor
Kaspaz -13	-		Bilinmiyor

1.2.4.1. Kaspazların Aktivasyonu

Kaspaz ailesi üyelerini inaktif formdan aktif forma dönüştüren genel olarak iki yolak bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; ölüm sinyali-uyarması, ölüm reseptörü aracılı yolaktır. Diğeri ise; stres kaynaklı, mitokondri aracılı yolaktır (örneğin: Kaspaz-9 bağımlı yolak).

Ölüm reseptörü aracılı yolakta Fas ligandı (FasL) ve TNF gibi ölüm sinyalleri, plazma membranında yer alan Fas ve TNF reseptör (TNFR)-1 gibi reseptörlerle belirli bir biçimde tanımlanabilirler. Fas, Fas ile ilgili ölüm alanına (FADD) bağlanabilir (ya da TNFR- ile ilgili ölüm alanı TRADD) ve FADD'nin agregasyonuna ve DED 'lerin (Ölüm etkin bölgeleri) ortaya çıkmasına neden olur. Bunlar pro-Kaspaz-8'in pro-domainindeki DED'ler ile etkileşime neden olurlar, böylece plazma membranının sitoplazmik kısmında lokalize olan pro-Kaspaz-8'in oligomerizasyonu uyarırlar. Daha sonra büyük karmaşık bir molekül biçimlenir. Kaspazların aktivasyonu hücre tiplerine göre farklılık göstermektedir. Şöyle ki; Tip 1 hücrelerinde (Bazı Lenfoid Hücreler) Kaspaz-8'ler hareketli bir şekilde aktif olurlar ve pro-Kaspazların akış yönünde doğrudan aktif olabilirler. Tip 2 hücrelerinde ise (Tip 1 hücrelerinin dışında) Kaspaz-8 az miktarda aktive olurken pro-Kaspaz-3'ün doğrudan aktive olması imkânsızdır. Ancak, mitokondri aracılı yolakta aktif olabilirler. Mitokondri aracılı kaspaz aktivasyon yolağı ise; sitokrom-c, AIF ve diğer moleküllerin mitokondriden salınımı ile söz konusu pro-Kaspazların aktivasyonu gerçekleşmektedir [49-52].



Şekil 7. Kaspazların aktivasyonu

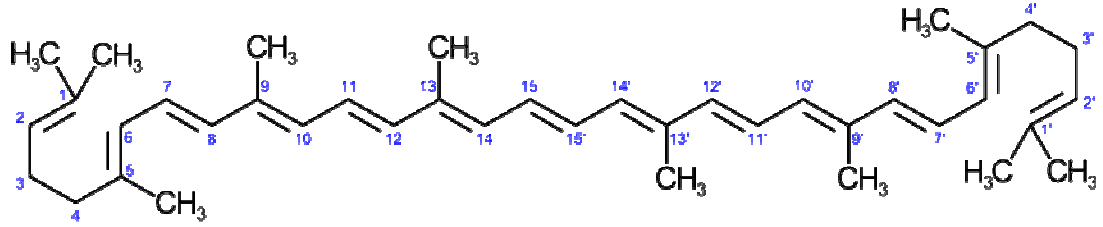
Şöyle ki; sitokrom-c bağımlı yolda pro-Kaspaz-8'in aktivasyonu için ne FADD ile etkileşimi ne de DISC kompleksinin oluşumu gerekir [53]. Mitokondri aracılı pro-kaspaz aktivasyonunda, pro-Kaspaz-9'un aktivasyonu hücrel stres oluştuğunda (örneğin: DNA hasarı) mitokondri geçiş porlarının açılmasını uyararak sitoplazmadaki pro-apoptotik proteinler aktive olacaktır. Böylece mitokondride lokalize olmuş sitokrom-c sitoplazmaya salıverilecektir. Sitoplazmada bulunan dATP (Deoksiadenozin trifosfat) ya da ATP'nin, Apaf-1 ile oligomerizasyonu gerçekleşir ve sitoplazmik pro-Kaspaz-9, dATP ve sitokrom-c oligomerize olmuş Apaf-1 ile birlikte "Apoptozom" olarak bilinen büyük kompleks bir oluşumla sonuçlanır. Apaf-1'in N-terminali ve pro-Kaspaz-9'un pro-domain'i CARD'a sahiptir [50].

Apaf-1 ve pro-Kaspaz-9 sahip oldukları bu alan sayesinde diğer proteinlerle etkileşmektedir. Aktif olan Kaspaz-9, pro-Kaspaz-3 ve pro-Kaspaz-7'leri aktif hale getirir. Aktifleşen Kaspaz-3, aktivasyon yolağında pozitif feedback ile pro-Kaspaz-9'u aktif hale getirecektir [54] (Şekil 7).

1.3. Likopen

1.3.1. Likopenin Yapısı

Likopen, çoklu doymamış hidrokarbon düz zincirinde 11 adet konjuge ve 2 adet non-konjuge olmak üzere toplam 13 çift bağ bulunduran hidrokarbon zincirin açık formundan oluşur. Aynı zamanda siklik olmayan açık polien zincirine sahip ve β iyonon halkası içermediği için A vitamini aktivitesinden yoksun bir karotenoidtir. Alfa-karoten zincirinin sonunda açık bir β -halkası bulunur (Şekil 8).



Şekil 8. Likopenin yapısı

Kimyasal reaksiyonlarda yüksek veya düşük enerjide bu bağlar trans formundan mono veya poli cis izomerizasyonuna maruz kalabilir. Likopen genellikle all-trans ve 5-cis, 9-cis, 13-cis ve 15-cis izomeri formu ile tanınır[55-58]. Konjuge çift bağ yapısı linear bir hat oluşturarak diğer karotenoidlerden daha uzun olmasını sağlar. Asiklik yapı ise likopenin simetrik bir yapıda olmasına olanak sağlamaktadır. Bu yüzden likopen vitamin A aktivitesinden yoksundur. Likopenin kırmızı rengi konjuge polien yapısına sahip olmasından ileri gelir [55].

Yapısındaki konjuge çift bağlar likopeni güçlü bir antioksidan yaptığı görüşüne inanılmaktadır. Likopenin antioksidan aktivitesi, tekli oksijen grupları yok etme özelliği ve peroksit radikallerini yakalama özellikleriyle belirlenir. Likopenin tekli oksijen (1O_2) gruplarını yok etme kapasitesi α -, β -karoten ve luteinden çok daha güçlüdür. Likopenin bu kabiliyeti β -karotenden 2 kat, α -tokoferol (Vitamin E)'den ise 10 kat daha fazladır. Likopenin bu kabiliyetinin, yapısında fazla sayıda bulunan çift bağlardan dolayı olduğuna inanılmaktadır [57,58].

İnsan plazmasında en yüksek düzeyde bulunan karotenoidlerden biri olan Likopenin yarı ömrü 2–3 gündür. Miktar olarak β -karotenden ve diğer diyetel karotenoidlerden daha fazla bulunur. Lipofilik özelliğinden dolayı likopen alındıktan sonra yağ misellerinin yapısına katılır ve

pasif diffüzyon yoluyla bağırsak mukozasından emilip karaciğere taşınır. Buradan dolaşıma geçerek organizmanın çok çeşitli dokularına ulaşır. Likopen öncelikle plazmadaki düşük (LDL) ve çok düşük yoğunluktaki lipoprotein (VLDL)'lere taşınır. Likopen kandaki LDL ve VLDL miktarını artırır. Likopen ayrıca karaciğerde, böbrek üstü bezlerinde, testislerde ve prostatta bulunur [59].

Diyet içerisindeki likopenin başlıca kaynakları kırmızı meyve ve sebzelerin türüne, olgunluğuna ve yetiştirildiği çevrenin koşullarına göre farklılık gösterir. Likopen; domates ve domates ürünleri (salça, ketçap, sos, domates suyu), karpuz, kayısı, kuşburnu, pembe greyfurt, papaya ve guava gibi bitkilerde yüksek miktarlarda bulunur [60]. Olgun domatesten yaklaşık olarak %80–90 arasında likopen bulunur. Çiğ domatesten normal olarak 3-5 mg/100g miktarında bulunur. Varyeteye göre likopen miktarı değişmekle birlikte 9,27 mg/100g dan fazla, bazı koyu kırmızı renkli domateslerde 15 mg/100g düzeyinde likopen bulunabilmektedir. Domatesin olgunluğu likopen miktarını artırır [55].

Domates ürünleri ile birlikte zeytinyağı tüketimi plazmadaki antioksidan aktiviteleri düzenlerken ayçiçeği yağı ile tüketimi bu özelliği sağlamaz [61]. Likopen içeren karotenoidler lipit miselleri ile birleşerek bağırsak mukoza yüzeyinden absorpsiyonu pasif difüzyon şeklindedir. Likopen şilomikron yapılara dahil edilerek karaciğere taşınmak üzere lenfatik sisteme bırakılır, ve en fazla hepatositler ve az miktarda ise dalakta birikir [62,63]. Karotenoidlerin diğer organlara dağılması plazmada lipoproteinlerle beraberdir [64]. Besin kaynaklarında likopenin trans formu hakimken insan plazmasında total likopenin % 50'si cis formundadır. Canlı sistemlerde izomerizasyonun gerekli gerekmediği veya cis likopenin tercih edilmesinin sebebi tam olarak bilinmemektedir [62].

1.3.2. Likopenin Antikanserojen Etkisi

Likopen birçok kanser türünde, kanserli hücrelerin çoğalmasını etkili bir şekilde baskılamaktadır. Likopenin kansere karşı olası korucu etkisiyle ilgili epidemiyolojik çalışmaların yanı sıra, birçok hayvan, doku ve hücre kültür çalışmaları likopenin antikarsinojenik potansiyelinin olduğunu göstermiştir [58]. Yapılan bir çalışmada, Hamsterlere DMBA uygulanarak oluşturulan yanak kesesi tümörüne domates ezmesinin etkileri incelenmiştir. 14 haftalık deney sonucunda domates ezmesinin Hamsterların yanak keselerinde oluşan tümörleri azaltmış olduğu tespit edilmiştir. Domates ezmesi, hedef organlarda lipid peroksidasyonu ayarlayarak ve antioksidanları destekleyerek kemoterapik etkisini göstermiştir [65].

Likopen'in antioksidan seviyelerini araştırmak amacıyla yapılan başka bir çalışmada, Hamsterların yanak keselerinde DMBA uygulanarak kanser oluşumu sağlanmıştır. 2,5 mg/kg likopen uygulaması yapılmış ve çalışma sonucunda likopenin DMBA'ya bağımlı oluşan karsinomaları anlamlı bir şekilde bastırdığı gözlenmiştir [66]. Yapılan bir hücre kültür çalışmasında ise kullanılan endometrial, meme ve akciğer kanser hücrelerinde likopenin antiproliferatif etkisinin olduğu ortaya konmuştur ve likopenin bu kanser hücrelerinin gelişip çoğalmasını inhibe ettiğini saptanmıştır. Likopen endometrial kanser hücrelerinin gelişiminin baskılanmasının yanı sıra insülin benzeri büyüme faktörü I'den kaynaklanan çoğalmayı da baskılamıştır [58].

Likopen aynı zamanda prostat kanserinde terapötik ajan olarak kullanılabileceği, Küçük ve arkadaşları [67], tarafından prostat kanserli hastalarda likopen alımının etkilerinin araştırıldığı klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Prostatektomiden önce hastalar üç hafta boyunca günde iki kez 15 mg likopen almışlardır. Üç hafta sonunda likopen alanların %80'inde daha küçük tümör görülürken kontrollerin %45'inde daha küçüktü. Sonuçlara göre likopen grubunda plazma prostat-spesifik antijen sayesinde %18 azalma görülürken, kontrollerde %14 artış görülmüştür. Günlük 30 mg likopen alımı prostat kanserindeki klinik markerlerin düzeltilmesinde yeterli olabileceği ve hastalığın tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir [58].

1.3.2.1. Hücre Döngüsünü Durdurucu Etkisi

Yapılan araştırmalarda likopenin prostat ve uterus kanser hücrelerinin gelişimlerini inhibe ettiği ortaya konmuştur. Likopen'in hücre gelişimindeki D1 döngüsünü düzenleyerek hücresel döngüdeki G0/G1 fazı arasında tutukluğa öncülük ettiği saptanmıştır. G0/G1 arasındaki tutukluk likopenle tedavi edilen lösemi hücrelerinde ve endometrial kanser hücrelerinde gözlenmiştir [68-71].

1.3.2.2. Haberleşmeyi Artırıcı Etkisi

Yapılan araştırmalar likopenin hücreler arası birleşme yerlerindeki haberleşmede etkisi bulunduğu ve doku homeostazisinde anahtar rol oynadığını ortaya koymuştur. Hücreler arası birleşme yerleri iki komşu hücre arasındaki bağlantı kanallarıdır. Bu kanallar sayesinde hücreler arası sinyal molekülleri ve besinler gibi küçük moleküllerin değiş dokuşu sağlanır [72-74].

1.3.2.3. IGF–1 Sinyal İletimini İnhibe Edici Etkisi

Serum İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF–1) konsantrasyondaki artış prostat kanseri gibi kanser tiplerinde risk artışı ile ilgilidir [75]. IGF–1 kan seviyesinin yüksek oluşu karaciğer, kolon, rektum ve prostat kanseri risklerinin artışı önceden haber veren belirteçlerdendir. Likopen, MCF-7 göğüs kanser hücrelerinde uyarılmış IGF-1 artışını önemli derecede düşürmüştür. İnhibisyon gelişimi G1/S hücre döngüsünün ilerlemesinin gecikmesiyle ilişkilidir. Bu etki IGF-1 bağlayan proteinlerin likopenle düzenlenmesi aracılığı ile olabilir [76]. Rat prostat kanser modelinde yapılan çalışmalarda besinlere 200 ppm likopen eklenmesi ile prostat tümörlerindeki lokal IGF-1 ekspresyonunun düşürüldüğü saptanmıştır [77].

1.3.3. Likopenin Antioksidatif Etkisi

Çeşitli stres faktörleri etkisi ile açığa çıkan reaktif oksijen ve nitrojen türleri; lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hücrel biyomolekülleri etkileyerek kanser gibi kronik hastalıklara yatkınlığı artırmaktadır. Bu sebeple antioksidanların diyetle alınması stratejik moleküllerin korunması ve oksidatif zarardan korunmada önemli rol oynadığı belirtilmiştir [78-80]. Plazmanın antioksidan kapasitesinin, antioksidan bileşiklerin konsantrasyonlarına ve sinerjilerine bağlı olduğu ve bu olayın özellikle oksidatif zarara karşı lipoproteinlerle savunmada suda çözünen ve lipofilik antioksidanlar arasında var olan etkileşimden kaynaklandığı saptanmıştır [81]. Karotenoidlerin insan lenfositlerini singlet oksijen zararından koruduğu, bazı kanser çeşitlerini içeren bir takım dejeneratif bozukluk risklerini düşürdüğü rapor edilmiştir. Likopen *in vitro* koşullarda güçlü bir antioksidan özellik gösterirken *in vivo* ortamlarda DNA, protein ve lipidlerin oksidasyonuna karşı koruyucudur [82]. Likopenin ratlarda *in vivo* şartlarda ve hücre kültüründe oksidatif DNA hasarını azalttığı saptanmıştır [83]. Ayrıca çok sayıda yapılan klinik çalışmalarda domates tüketiminin, insan lökositlerinde oksidatif DNA hasarını önlediği kanıtlanmıştır [84]. Yine Bowen ve arkadaşları [85], likopen bakımından zengin diyetin prostattaki oksidatif DNA zararını azalttığını tespit etmişlerdir. Likopenin antioksidan özelliklerinin yanı sıra antikanserojen, gelişim faktörleri, bazı hormonlar ve sitokinlerin sinyal iletimi, hücrel haberleşme ve hücre ölümlerini düzenleme gibi önemli biyolojik süreçlere etkileri de bulunmaktadır [86].

Bu bilgilerin ışığı altında, bu araştırmada, likopen'in 7,12-dimetilbenzantrazen (DMBA) uygulanan ratların karaciğer dokusundaki bazı apoptotik markerlar üzerine etkileri araştırılacaktır. Bu amaçla, tümör biomarkerlarından olan Bax, Bcl-2, Kaspaz 9 ve Kaspaz 3 proteinlerinin karaciğer dokusundaki ekspresyon düzeyleri ve ayrıca MDA ve GSH düzeyleri belirlenecektir.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Hayvan Materyali

Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra (Tarih: 02.07.2008, Toplantı: 7, Karar No:38) çalışmalara başlandı.

Deneylerde kullanılan Wistar albino cinsi ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal musluk suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 2.'de gösterilmiştir. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 2. Diyetin bileşimi

Yem maddeleri	Yüzdesi (%)
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8
E-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

*Vitamin karması: Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karmasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolin klorit bulunmaktadır.

**Mineral karması: Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyumdan oluşmuştur.

2.2. Deneme Düzeni

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Deney hayvanlarının bulundukları ortam sıcaklığı 22 ± 2 °C ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde takip edildi. Hayvanlara yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Deneysel çalışmalarda, ortalama ağırlıkları 180–200 g olan toplam 30 adet Wistar albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar rastgele aşağıdaki şekilde gruplandırıldı:

- 1. Kontrol Grubu** (n=10): DMBA uygulanmayan ve bazal diyetle beslenen grup.
- 2. DMBA Grubu** (n=10): DMBA uygulanan ve bazal diyetle beslenen grup.
- 3. DMBA+ Likopen Grubu** (n=10): DMBA uygulanan ve 20 mg/kg/gün/canlı ağırlık likopen verilen grup.

Bu araştırmada, kontrol grubu dışındaki ratlara 40 mg/kg/canlı ağırlık dozunda 7,12-dimetilbenzantrazen (Sigma Chemical Company, USA) araştırmanın birinci ve 30. gününde intraperitoneal olarak uygulanmıştır. DMBA+Likopen grubuna 20 mg/kg/gün/canlı ağırlık dozunda likopen oral yolla uygulanmış ve uygulamaya 20 hafta süreyle devam edilmiştir. 20 hafta süren araştırma sonunda hayvanlar anestezi altında dekapite edilerek doku örnekleri alınmış ve analizler yapılncaya kadar -70 °C’ de saklanmıştır.

2.3. Örneklerin Alınması

Deneysel uygulamalar sonrasında etik kurulun aldığı kararlara uygun olarak dekapite edilen ratların karaciğerleri alınarak, kuru buzda hemen donduruldu. Örnekler darası alınmış olan tüplere aktarıldı. Ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlendi ve analizler yapılncaya kadar -70 °C’ de saklandı.

2.4. Örneklerin Hazırlanması

Karaciğer örneklerinin hazırlanmasında, Tuzcu [87], tarafından uygulanan homojenizasyon yöntemi kullanıldı. Taze veya dondurulmuş dokular 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solüsyonunda [10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid (PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak)] karaciğer dokusu cam homojenizatör yardımıyla soğuk

ortamda homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C’ de 60 dakika süreyle 60.000 x g’de santrifüj edildi. İlk süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak LPO ve GSH analizleri yapılmaya kadar –70 °C’ de saklandı. Pelletler, eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solusyonunda [25 mM Tris-HCl (pH= 7.4), 0.1mM PMSF, % 2’lik TritonX –100 ve % 1’lik SDS] yeniden süspanse edildi. +4 °C’ de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C’ de 60 dakika süreyle 60.000 x g’de santrifüj edildi. Elde edilen 2. süpernatantlar mikrosantrifüj tüplere alınarak SDS-PAGE ve Western blot analizleri için –70 °C’ de saklandı.

2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi(SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektroforez jel sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat (APS) gibi bir serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanal bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir. SDS-PAGE analizinde jelin yapısında yer alan sodyum dodesilsülfat (SDS) deterjanın bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilmeye çalışılır. Protein moleküllerinin hareketi güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 0–43 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa’dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürülür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürülür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı, jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır [87].

Kullanılan çözeltiler

- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
- 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)
- % 10 Sodyum dodesilsülfat çözeltisi (SDS)
- %30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi
- %10 Amonyum persülfat çözeltisi (APS)
- N, N, N', N', -tetrametil-etilendiamin (TEMED)
- Gliserin
- 2-β-merkaptoethanol
- %0,05 Bromofenol blue çözeltisi
- Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 ml):
 - %0.1 Coomassie blue R-250
 - %45 Metanol
 - %10 Glasiyal asetik asit
 - %45 Distile su
- Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100ml):
 - %45 Metanol
 - %10 Glasiyal asetik asit
 - %45 Distile su
- Tank solusyonu (Running buffer, pH 8.3):
 - Tris base 9.0 gr
 - Glisin 43.0 gr
 - Distile su 600 ml

SDS-PAGE için jellerin hazırlanması;

Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (% 12)	Miktar
Distile su	3.35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
Akrilamid /Bis (%30)	4.0 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	5 µl
Toplam	10.0 ml

Stacking jelin hazırlanması (% 4)	Miktar
Distile su	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
SDS (%10)	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml
Amonyum persüfat (%10)	50 µl
TEMED	10 µl
Toplam	10.0 ml

Örnek solusyonların hazırlanması	Miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml	0.125 M
% 10 SDS	1.6 ml	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 ml	%0.002
Gliserol	0.8 ml	% 20
2-β-merkaptoethanol	0.4 ml	%10
Distile su	3.75 ml	-
Toplam	8.0 ml	-

2.5.1. Örneklerin SDS-PAGE ile Analizi

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli [88], tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi.

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik separating jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar ($\approx 1\text{cm}$) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin dolgu maddesi olarak ifade edilen stacking jel, 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solüsyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu, iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Stacking jel çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25–30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin

bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solüsyonu; 0,125 M Tris (pH 6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20'lik gliserol, %10'luk merkapttoethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solüsyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dışının genişliğine bağlı olarak hazırladığımız karışımdan 10-20 µl kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solüsyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5–10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en fazla bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solüsyonundan alınan jel boyayı giderici solüsyon (destain solüsyon) ortamına alındı. Ara sıra çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solüsyonda 5'er dakika bekletildi ve solüsyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2–3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş olundu. Jel üzerinde görünür hale gelen protein bantlarının fotoğrafları bir kamera yardımıyla çekildi.

2.6. Western Blot

Western blot; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir. Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikörlerle tepkime ve en son aşamada ise

proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır. Nitroselüloz membrana transfer sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kâğıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir. Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Western blotta monoklonal antikorların kullanımının en büyük dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır. Özgül antikorlarda raportör madde olarak genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak alkalen fosfataz ve peroksidaz enzimleri tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda enzimle işaretlemeye, testin duyarlılığını arttırmak amacıyla peroksidazla işaretli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır [87].

2.6.1 Örneklerin Western Blot ile Analizi

Karaciğer örneklerinin Western blot analizleri Tuzcu [87], tarafından uygulanan metoda göre yapıldı.

Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc., USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solüsyonuyla doyuruldu.

Soğutulmuş tampon solüsyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solüsyonla $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)] çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5'er dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl , 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sıgır serum albumini ile 37 °C' de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

Özgül antikorlarla tepkime: Primer antikor olarak poliklonal rabbit anti-rat Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 antikorları kullanıldı. Bax primer antikoru % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:500 oranında hazırlanarak kullanıldı. Bcl-2, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 primer antikorları ise % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:100 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar primer antikorlar ile +4 °C' de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5'er dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37 °C' de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image analyses system (Image J National Institute of Health Bethesda, USA) programı kullanılarak analiz edildi.

2.7. Örneklerde Malondialdehit (MDA) Analizi

Karaciğer örneklerindeki MDA konsantrasyonu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) kullanılarak ölçüldü [89], 250 nm'de İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4,6 mm) kolonu kullanıldı.

HPLC İçin Doku Homojenizasyonu:

- Her deney gurubundan 150'şer mg karaciğer dokusu alındı.
- Üzerine 450 µl deiyonize su ve 50 µl butilat hidroksitoluen (BHT) eklenerek cam homojenizatörde doku parçalandı.
- 0.5 M HClO₄' den 500 µl ilave edilerek proteinler çöktürüldü.
- Karışım 4500 devir/dk. hızla soğutmalı santrifüjde 5 dk. boyunca santrifüjlendi.
- Supernatant kısımlar dikkatlice alınarak HPLC viallerine aktarıldı.
- Tüm işlemler boyunca homojenatlar ve kimyasallar ışıktan korundu ayrıca soğuk zincire riayet edildi.

HPLC' de MDA Analizi:

- Hareketli faz olarak 30 mM KH₂PO₄ - metanol (% 82,5 – 17,5; pH: 4) kullanıldı.
- 250 nm'de İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4,6 mm) kolonu kullanıldı.
- Akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlendi.

MDA için geri kazanım % 98,8 olarak bulundu.

2.8. Örneklerde Glutasyon (GSH) Analizi

Örneklerdeki Glutasyon (GSH) seviyeleri, GSH-400 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

Kullanılan maddeler:

- Ayıraç I (R1); 0.2 N HCl de hazırlanmış 1.2×10^{-2} M kromojenik ayıraç solusyonu,
- Ayıraç II (R2); % 30 NaOH,
- Tampon solusyonu (S3); 0.2 mM dietilen triamin penta asetik asit (DTPA) ve % 25 (w/v) lubrol içeren 20 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) solusyonu.

Yöntem:

- Standart solusyonlarının hazırlanması:
 - Standart konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$): 0 20 40 60 80 100
 - Tampon S3 (μl): 900 860 820 780 740 700
 - GSH çalışma solusyonu (0.5 mmol) (μl): 0 40 80 120 160 200
- Kör, standart ve örnekler için polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.
- Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solusyonlarından 100 μl alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.
- Kör için hazırlanmış tüpe 100 μl kör solusyonu alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.
- Örnekler için hazırlanmış tüplerin her birine 100 μl örnek alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.
- Kör, standart ve örnek tüplerinin her birine 50 μl R1 ayıracından eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.
- Kör, standart ve örnek tüplerinin her birine 50 μl R2 ayıracından ilave edilerek karanlık ortamda 25 °C' de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler küvetlere aktarıldı ve absorbansları 400 nm' de spektrofotometrede okundu.
- Örneklerin okunan absorbans değerleri, kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

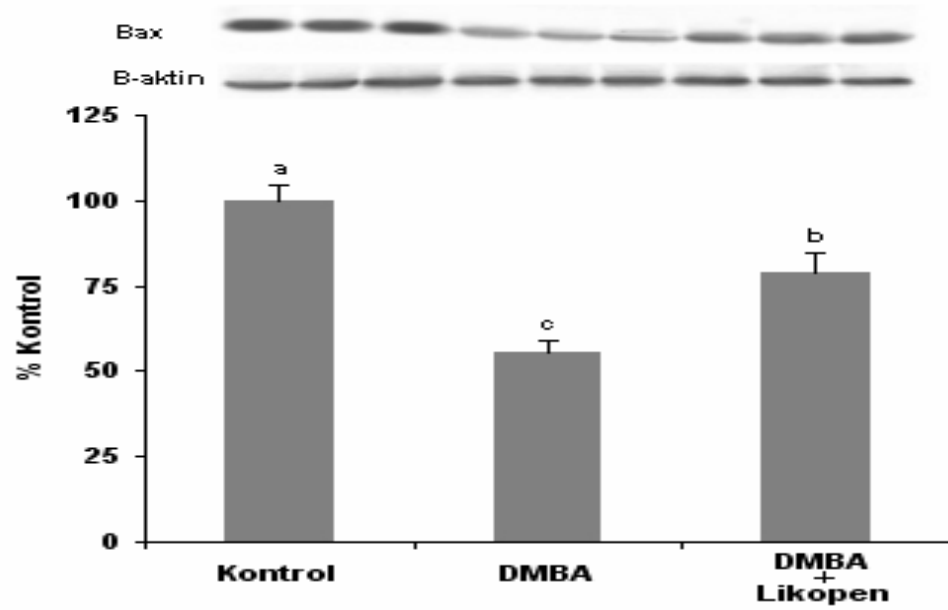
2.9. İstatistiksel Analizler

Veriler SAS [90], paket programında PROC GLM prosedürü ile analiz edildi. Grupıı farklılığı ortaya koymak amacıyla Fisher pst hoc testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık $P<0.05$ olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

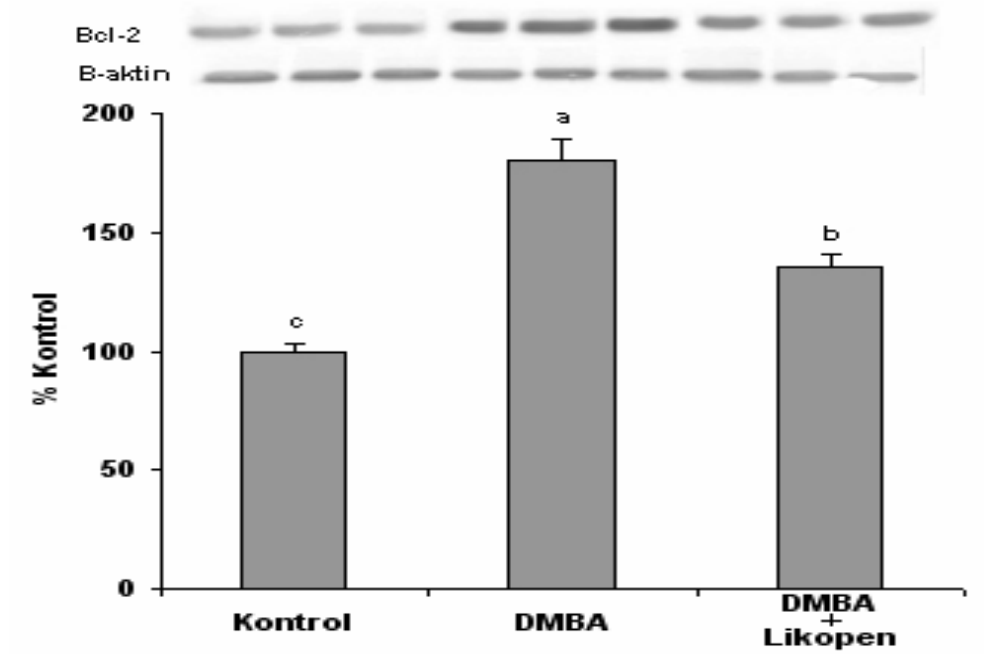
Karaciğer doku homojenatlarında pro-apoptotik Bax, anti- apoptotik Bcl-2, aktif Kaspaz-3, aktif Kaspaz-9 ekspresyonları, MDA ve GSH düzeyleri sırası ile Şekil 9, 10, 11, 12, 13 ve 14 de gösterilmiştir.

Bax ekspresyonu kontrole göre DMBA uygulanan ratlarda önemli düzeyde azalmış ancak likopen suplementasyonu ile Bax düzeyinde artış tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Şekil 9).



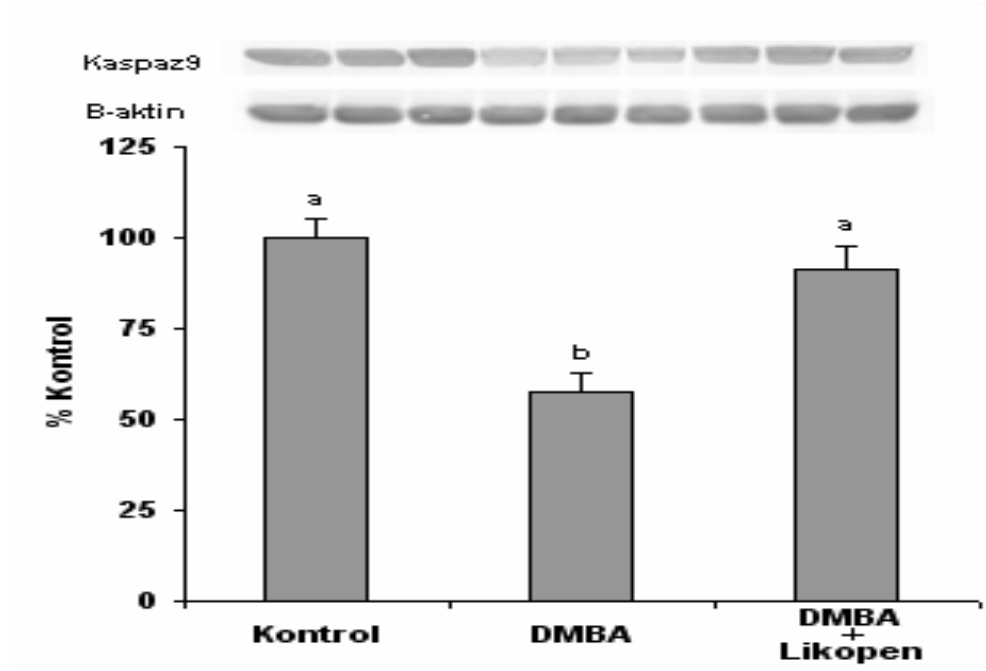
Şekil 9. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda pro-apoptotik Bax ekspresyon düzeyleri. a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.05$).

Bcl-2 ekspresyonu kontrole göre DMBA uygulanan ratlarda önemli düzeyde artmış ancak likopen suplementasyonu ile Bcl-2 düzeyinde bir azalma tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Şekil 10).



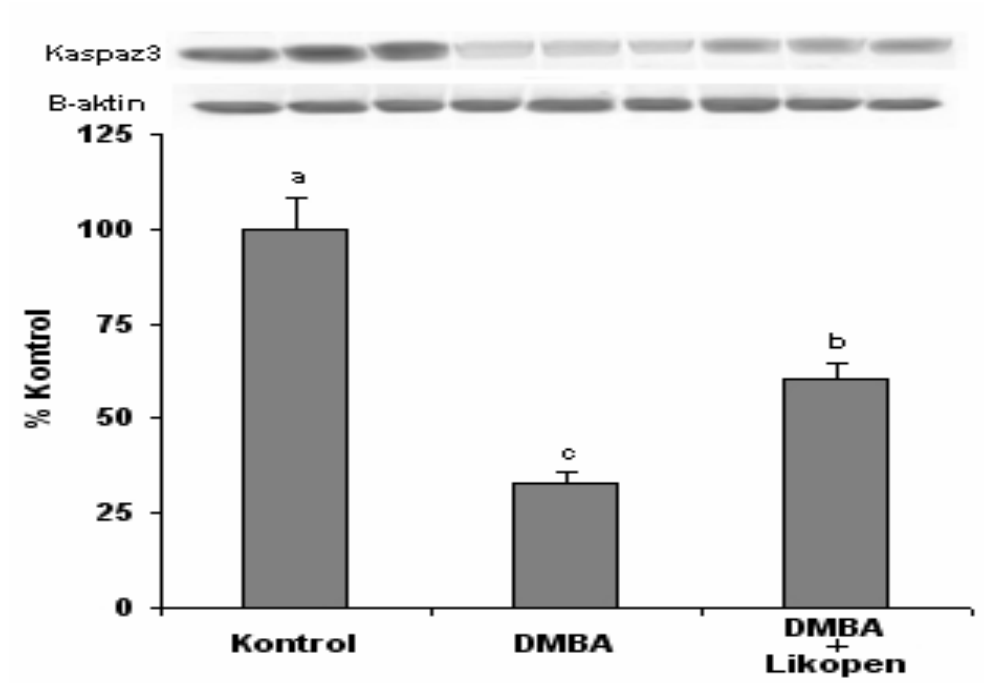
Şekil 10. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyon düzeyleri. a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.05$).

Aktif Kaspaz-9 ekspresyonu kontrole göre DMBA uygulanan ratlarda önemli düzeyde azalmış ancak likopen suplementasyonu ile Aktif Kaspaz-9 düzeyinde artış tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Şekil 11).



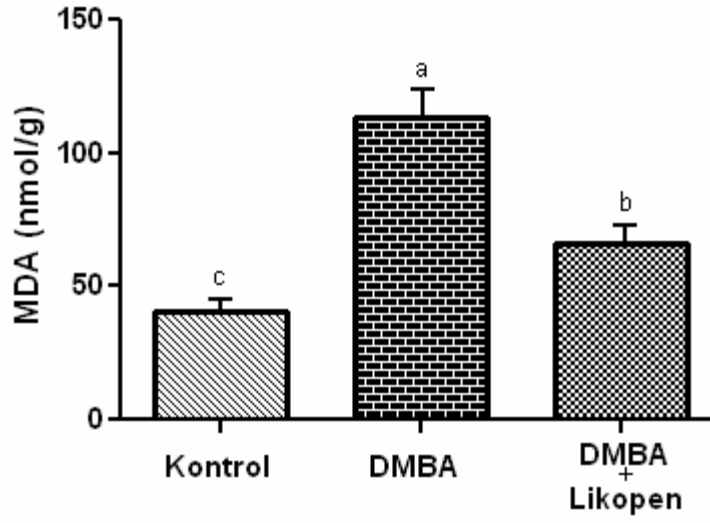
Şekil 11. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda aktif Kaspaz-9 ekspresyon düzeyleri. a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.05$).

Aktif Kaspaz-3 ekspresyonu kontrole göre DMBA uygulanan ratlarda önemli düzeyde azalmış ancak likopen suplementasyonu ile Aktif Kaspaz-3 düzeyinde artış tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Şekil 12).



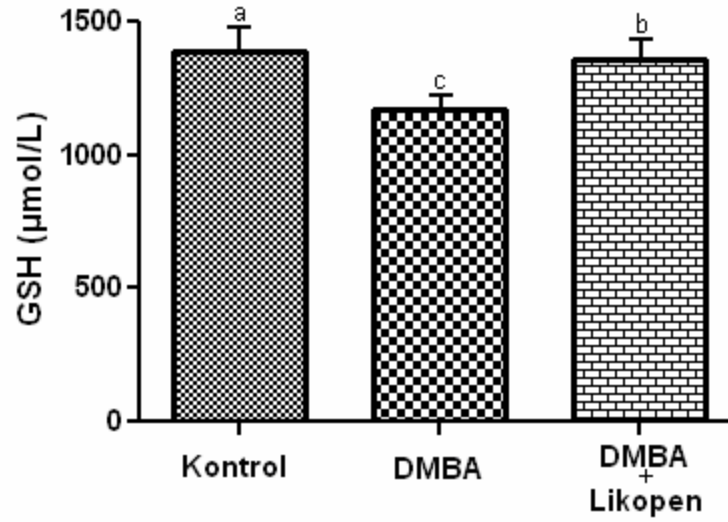
Şekil 12. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda aktif Kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri. a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.05$).

Karaciğer; MDA düzeyi kontrol, DMBA ve DMBA+Likopen grubunda sırası ile 40.5, 113.1 ve 66.4 nmol/g olarak tespit edilmiştir ($P<0.001$) (Şekil 13).



Şekil 13. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda MDA düzeyleri. a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.001$).

Karaciğer; GSH düzeyi kontrol, DMBA ve DMBA+Likopen grubunda sırası ile 1390.8, 1169.9 ve 1362.3 $\mu\text{mol/L}$ olarak tespit edilmiştir ($P<0.001$) (Şekil 14).



Şekil 14. DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda GSH düzeyleri. a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.0001$).

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücre içi sinyal ağındaki işlevsel anormallikler, kritik hücresel bileşenler tarafından sürdürülen homeostazinin bozulmasına neden olur. Bu da; pre-malign ve malign dönüşümünü hızlandırmaktadır [91]. Apoptozis, çok hücreli organizmaların normal gelişimi esnasında ve yetişkin yaşamları boyunca gerçekleşmektedir. Normalde apoptozis; gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücre popülasyonunun devamlılığının sürdürülmesi için homeostatik mekanizma süresince gerçekleşir. Apoptozis, pek çok farklı sinyal yolağı ve hücre ölümü esnasındaki değişikliklerin sonucunu içeren kompleks bir süreçtir. Apoptotik mekanizma, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki denge değişiminin sonucunda tetiklenir. Apoptozis, kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemede kullanılan etkin stratejilerden bir tanesidir [92]. Apoptozisi uyarması ile anti kanserojenik etkiye sahip olan pek çok kemopreventif ajan vardır [93]. Kemopreventif ajanlar, tümör hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonların bozulması ile apoptozisi indükleyen kesin bir role sahiptirler [94]. Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalardan elde edilen kanıtlar, kimyasal ajanlar tarafından tetiklenen tümör gelişiminin apoptozisi baskıladığı tespit edilmiştir [95]. Bunun yanı sıra Curcumin, resveratrol ve flavon gibi doğal bileşenlerin, yapılan *in vitro* çalışmalarda pre-malign ve malign hücrelerde apoptozisi uyardığı rapor edilmiştir[96-98].

Likopen, domateste bulunan major bir karotenoidtir ve diğer karotenoidlerle karşılaştırıldığında daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir [99]. Likopenin anti kanserojen etkisi, hayvanlarda oluşturulan kanser modellerinde tespit edilmiştir [100].

Bu çalışmada, potansiyel mutajenik ve karsinojenik özelliklere sahip olan 7,12-dimetilbenzantrasen (DMBA) uygulanan ratların karaciğer dokusunda apoptoziste önemli rolleri olan Bax, Bcl-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3, MDA ve GSH üzerine likopen suplemantasyonunun etkileri araştırılmıştır.

Apoptozis, biyomoleküllerin büyük bir kısmında içeren, pro-apoptotik ve anti-apoptotik efektörler tarafından düzenlenmektedir. Bcl-2 ailesi üyeleri, apoptozisin uyarılmasında ve anti-kanser tedavisinde hedef olarak dikkate alınmaktadır [101, 102]. Onkoprotein olan anti-apoptotik Bcl-2, fonksiyon olarak apoptozisin baskılanması ve tümör gerilemesinin negatif yönde düzenlenmesine neden olur [103, 104]. Öte yandan pro-apoptotik Bax'ın, anti-apoptotik Bcl-2 üzerine olan öncül dominansı apoptozis oluşumunu teşvik eder [105]. Bu çalışmada, karaciğer dokusundaki pro-apoptotik Bax ekspresyonunun, DMBA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azaldığı, DMBA+Likopen grubunda ise bu oranın kontrol grubuna yaklaştığını gözlemlenmiştir. Anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunun ise DMBA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla arttığını,

DMBA+Likopen grubunda ise bu oranın kontrol grubuna yaklaştığını tespit edilmiştir. Bu çalışmada Likopen suplementasyonu, pro-apoptotik Bax'ın (Şekil 9) ekspresyonunu artırmak ve anti-apoptotik Bcl-2'nin (Şekil 10) ekspresyonunu baskılamak suretiyle Bax/Bcl-2'nin dengesini Bax yönünde bozduğu gözlemlenmiştir. Bax/Bcl-2 proteinleri arasındaki bu ilişki likopen suplementasyonunun mitokondriyal yolağı kullanarak apoptozisi uyardığını doğrulamaktadır. Yapılan benzer çalışmalarda apoptozis esnasında anti-apoptotik Bcl-2 proteine göre pro-apoptotik Bax'ın oranının arttığı gözlemlenmiştir [106]. Karla ve arkadaşları [107], DMBA uygulamasıyla ratlar üzerinde oluşturulan deri tümörlerinde anti-apoptotik Bcl-2 proteinin ekspresyonunun azaldığını, pro-apoptotik Bax proteinin ise ekspresyonun arttığını rapor etmişlerdir. Liu ve arkadaşları da [108], ratlarda DMBA ile uyarılan meme kanserinde, anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunun azaldığını, pro-apoptotik Bax proteinin ise ekspresyonunun arttığını ve apoptozisi uyardığını bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise Chaudhary ve arkadaşları [109], DMBA/TPA ile oluşturulan deri tümörlerinde anti-apoptotik Bcl-2 proteinin ekspresyonunun azaldığını, pro-apoptotik Bax proteinin ise ekspresyonun arttığını ve bu değişimin apoptozisi tetiklediğini rapor etmişlerdir.

Mitokondri, apoptoziste önemli bir yeri olan kavşak noktası iken, Bax ise mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun başlangıcında temel bir rol oynar Bax'ın hücre içi hareketi mitokondri membran potansiyalinin kaybolması ve geçirgen porların şekillenmesi ile dış membrandaki açıklıklar boyunca sitokrom-c'nin salıverilmesini içerir. Salınan sitokrom-c, sonradan pro-kaspaz-3'ün aktif Kaspaz-3 haline dönüşmesini sağlayan, Kaspaz-9, sitokrom-c ve Apaf-1 den oluşan "Apoptozom" halini alır [106]. Bu çalışmada, karaciğer dokusundaki aktif Kaspaz-9 ekspresyonunun, DMBA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azaldığı, DMBA+Likopen grubunda ise bu oranın kontrol grubuna yaklaştığını gözlemlenmiştir. Mitokondriyal yolağın göstergesi niteliğinde olan ve apoptozomun yapısında yer alan aktif Kaspaz-9 (Şekil 11) ekspresyonunun likopen suplementasyonu ile seviyesinin arttırıldığı tespit edilmiştir. Bhattacharyya ve arkadaşları [110] DMBA ile oluşturdukları deri tümörlerinde aktif Kaspaz-9 ekspresyonun arttığını bildirmişlerdir. Giganti ve arkadaşları da [111], DMBA ile oluşturdukları meme bezi tümöründe aktif Kaspaz-9 ekspresyonunun artışının anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise Kundoor ve arkadaşları [112], tüysüz farelere DMBA uygulayarak oluşturulan deri tümörlerinde aktif Kaspaz-9 ekspresyonun arttığını bildirmişlerdir. Kalra ve arkadaşları, DMBA [107], uygulamasıyla ratlar üzerinde oluşan tümörlerde aktif Kaspaz-9 ekspresyonun arttığını tespit etmişlerdir.

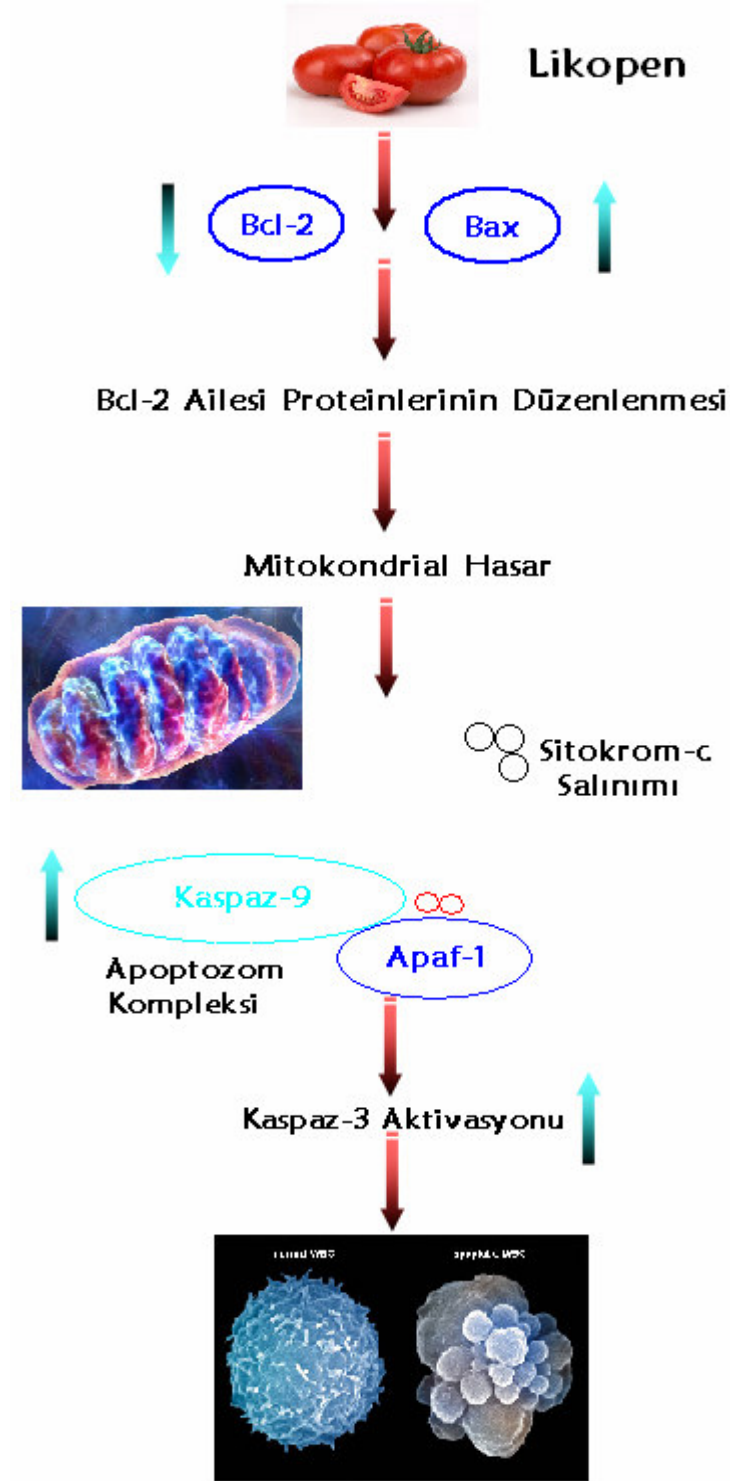
Kaspaz ailesine ait proteolitik bir enzim olan Kaspaz-3 (32 kDa), hücre içerisinde öncüsü olarak daima pro-Kaspaz-3 (20 kDa) halinde bulunmaktadır. Pro-Kaspaz-3'ün aktifleşmesi, apoptotik aktivitenin belirleyicisidir [106, 113], Bu çalışmamda aktif kaspaz-3 ekspresyonunun, DMBA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azaldığını, DMBA+Likopen grubunda ise bu oranın DMBA grubuna oranla artığı gözlemlenmiştir. Apoptoziste, hücre için hayati öneme sahip hedef proteinleri parçalayan aktif Kaspaz-3 ekspresyonunun, likopen suplementasyonu ile seviyesinin artırıldığı tespit edilmiştir (Şekil 12). Kalra ve arkadaşları, [107], DMBA uygulamasıyla ratlar üzerinde oluşan tümörlerde aktif Kaspaz-3 ekspresyonunun artığını tespit etmişlerdir Bhattacharyya ve arkadaşları da [110], DMBA ile oluşturdukları deri tümörlerinde aktif Kaspaz-3 ekspresyonunun artığını bildirmişlerdir.

Reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi ve membran lipidlerinin peroksidasyonu, normal biyokimyasal süreci etkileyerek kanser oluşumunun başlangıcı ile ilişkilidir. Serbest radikallerin üretimi, hedef doku ve hücredeki antioksidan seviyenin azalmasına bağlı olarak oksidatif stresin uyarılması kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır [115]. Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonun oluşma sıklığı, kanser oluşma süreciyle ilişkilidir [116], MDA düşük moleküler ağırlıklı bir aldehittir ve serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asitlerini etkilemesiyle de üretilebilir. MDA, oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olup kanser gelişimi esnasında antioksidanların düzenlenmesi ve lipid peroksidasyonunda önemli rol oynar [117]. Tarafımızdan yürütülen bu çalışmada, DMBA uygulanan grubun MDA seviyesinin kontrol grubuna oranla daha fazla olduğunu, DMBA+Likopen grubunda ise MDA seviyesinin kontrole yaklaştığını tespit edilmiştir. Çalışmada, karaciğerdeki MDA düzeyinin likopen suplementasyonu ile düşürüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 13). Arulkumar ve arkadaşları [118], DMBA uygulamasının karaciğer dokusuna ait MDA düzeyinin artığını bildirmişlerdir. Bishayee ve arkadaşları da [119], DMBA ile oluşturdukları meme kanserinde karaciğerdeki MDA düzeyinin yükseldiğini tespit etmişlerdir. Şahin ve arkadaşları [120], ise; diyetel domates tozunun serum ve karaciğerdeki MDA düzeyini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada, Şahin ve arkadaşları [69], likopen suplementasyonunun serum ve karaciğerdeki MDA düzeyini düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Glutasyon, tripeptid yapıda bir molekül olup, glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşmuştur. γ -Glutamil-Sisteinil-Glisin diye de adlandırılır. GSH, memeli hücrelerinde 12 mM üzerindeki konsantrasyonlarda mevcut olan bir tiyol bileşiğidir [121]. GSH reaktif oksijen türlerinin doğrudan toksik etkisini nötralize ederek hücreyi oksidatif stresten koruyan bir bileşiktir [122]. Mishra ve arkadaşları [123] artan GSH seviyesinin, serbest radikalleri nötralize ederek

DMBA ile uyarılmış meme kanserinin inhibisyonunu sağladığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada DMBA uygulanan grubun GSH seviyesinin kontrol grubuna oranla daha az olduğunu, DMBA+Likopen grubunda ise GSH seviyesinin kontrole yaklaştığı tespit edilmiştir. Likopen suplemantasyonunun, karaciğer dokusundaki GSH seviyesini artırdığını tespit edilmiştir (Şekil 14). Yapılan bir başka çalışmada ise DMBA uygulanarak oluşturulan Hamsterların yanak keseleri karsinogenezinde, domates ezmesinin etkisi incelenmiştir. Deney sonucunda peroksidasyonu ve GSH bağımlı antioksidanlar, tümör, karaciğer ve eritrositlerde ölçülmüştür. Domates ezmesinin uygulanması; lipid proksidasyonunu düzenlemiş GSH ve GSH-bağımlı enzimleri arttırmıştır [65]. Choi ve arkadaşları [124], DMBA ile oluşturdukları oksidatif strese GSH düzeyinin arttığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusunda, anti-apoptotik Bcl-2'nin inhibisyonunu, pro-apoptotik Bax, aktif Kaspaz-9 ve aktif Kaspaz-3'ün ekspresyonlarını arttıran likopen suplemantasyonunun, mitokondriyal hücre ölüm yolağını kullanarak apoptozisi uyardığı tespit edilmiştir (Şekil 15). Ayrıca likopenin bu ratlarda MDA'yı azatlığı ve GSH artırdığı belirlenmiştir. Potansiyel kemoterapötik ajan olan likopen, ortaya konulan kemopreventif etkisiyle *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda moleküler hedefe yönelik olarak kullanılabilir.



Şekil 15. Likopen suplemanının DMBA uygulanan ratların karaciğer dokusundaki apoptotik proteinler üzerine etkileri.

KAYNAKLAR

1. Karakaya, A., 2003, Polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruz kalan bir grup işçide hücrel immün fonksiyonların incelenmesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (98-03-00-07).
2. Bloch, B., Drefuss, W., 1921, Veber die experimentelle erzeugung carcinomen mitlymphdrüsen and iungenmetastagen, Durch Teerbestandteile, Schweiz Med, Noschshr, 5, 1033-37.
3. Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., 1992, The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis the central role of radical cations in metabolic activation, Pharmacology Therapeutics, 552, 183-99.
4. Desai, V.G., Casciano, D., Feuers, R.J., Aidoo, A., 2001, Activity profile of glutathione-dependent enzymes and respiratory chain complexes in rats supplemented with antioxidants and treated with carcinogens, Biochemistry and Biophysics, 394 2, 255–64.
5. Batcioglu, K., Karagözler, A.A., Ozturk, I.C., Genc, M., Bay, A., Ozturk, F., Aydogdu, N., 2005, Comparison of chemopreventive effects of vitamin E plus selenium versus melatonin in 7,12- dimethylbenz(a)anthracene-induced mouse brain damage, Cancer Detection and Prevention, 29, 54–58.
6. Khaidakov, M., Bishop, M.E., Manjanatha, M.G., Lyn-Cook, L.E., Desai, V.G., Chen, J.J., Aidoo, A., 2001, Influence of dietary antioxidants on the mutagenicity of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and bleomycin in female rats, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 480–481, 163–70.
7. Gopisetty, G., Das, P.M., Ramachandran, K., VanWert, J., Ferdinand, L., Reis I.M. and Singal, R., 2006, Methylation mediated silencing of TMS1/ASC gene in prostate cancer, Molecular Cancer, 5, 28.
8. Turgut, B., Demir, T., Celiker, Ü., 2006, Oftalmolojide Apoptoz , Fırat Tıp Dergisi, 11(1), 6-11.
9. Tomatır, A.G., 2003, Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, T Klin Tıp Bilimleri, 23, 499-508.
10. Erdoğan, B.B., Uzaslan, E.K., 2003, Apoptozis Mekanizmaları: Tumor Gelişiminde Fas-FasL Bağlı Apoptozis, Akciğer Arşivi, 4, 165-174.
11. Sunguroğlu, A., Erdemli, E. A., Tekelioğlu, M., 1996, Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptozis, T Klin Tıp Bilimleri, 1996, 16.
12. Nagata, S., Golstein, P., 1995, The Fas death factor, Science, 267, 1449-56.

13. Eichhorst, S.T., Krammer, P.H., 2001, Derangement of apoptosis in cancer, *The Lancet*, 358,345-6.
14. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. and Nagata, S., 1991, The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis, *Cell*, 66, 233-243.
15. Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J. and Trauth, B.C., 1992, Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily: sequence identity with the Fas antigen, *J Biol Chem*, 267, 10706-15.
16. Nagata, S., 1997, Apoptosis by death factor, *Cell*, 88, 355-65.
17. Behnia, M., Robertson, K.A., Martin, W.J., 2000, Lung infections: Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease, *Chest*, 117, 1771-7.
18. Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J., and Mountz, J.D., 1994, Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule, *Science*, 263, 1759-62.
19. Knox, P.G., Milner, A.E., Gren, N.K., Eliopoulos A. G. and Lawrence, Y.S., 2003, Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas Ligand, *J Immunol*, 170, 677-85.
20. Kuwano, K., Kawasaki, M., Maeyama, T., Hagimoto, N., Nakamura, N., Shirakawa, K. and Hara, N., 2000, Soluble form Fas and Fas Ligand in BAL fluid from patients with pulmonary fibrosis and bronchiolitis obliterans organizing pneumonia, *Chest*, 118,451-8.
21. Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A.H., and Nagata, S., 1996, Fas ligand in human serum, *Nature Med*, 2, 317-22.
22. Rao, L. and White, E., 1997, Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection, *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 7, 52-58.
23. Wang, E., Marcotte, R. and Petroulakis, E., 1999, Signaling pathway for apoptosis: a racetrack for life or death, *J.Cell Biochem. Suppl*, 32-33, 95-102.
24. Borner, C., 2003, The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions, *Mol.Immunol*, 39, 615-647.

25. Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L. and Korsmeyer, S. J., 1985, Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18, *Cell*, 41, 899-906.
26. Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M., 1985, The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining, *Science* 229, 1390-1393.
27. Tsujimoto, Y. and Croce, C.M., 1986, Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 5214-5218.
28. Cleary, M. L., Smith, S. D., and Sklar, J., 1986, Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl- 2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation, *Cell* 47, 19-28.
29. Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M., 1988, Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c- myc to immortalize pre-B cells, *Nature*, 335, 440-442.
30. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., and Korsmeyer, S. J. 1990, Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death, *Nature*, 348, 334-336.
31. Al-Rubeai, M. and M. Fussenegger (eds.), 2004, *Cell Engineering*, Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands, 4, 1-49.
32. Youle, R.J. and Strasser, A., 2008, The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death, *Nat. Rev. Mol.Cell Biol.*, 9, 47–59.
33. Strasser, A., 2005, The role of BH3-only proteins in the immune system, *Nature Reviews Immunology*, 5, 189-200.
34. Ardjomande, S.A., Martinou, J.C., 2005, Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane, *C R Biol*, 328, 7, 616-31.
35. Bao, Q. and Shi, Y., 2007, Apoptosome: A platform for the activation of initiator caspases, *Cell Death Differ*, 14: 56–65.
36. Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J., 1998, Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis, *EMBO J*, 17, 3878-3885.
37. Minn, A. J., Swain, R. E., Ma, A. and Thompson, C. B., 1998, Recent progress on the regulation of apoptosis by Bcl-2 family members, *Adv.Immunol*, 70, 245-279.

38. Korsmeyer, S. J., 1999, BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death, *Cancer Research*, 59, 1693-1700.
39. Hengartner, M.O., 2000, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 6805, 770-6.
40. Adams, J. M. and Cory, S., 2001, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 61-66.
41. Dash, P., Apoptosis, Basic Medical Sciences, St.George's, University of London, www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash.
42. Potts, M.B., Vaughn, A.E., McDonough, H., Patterson, C. and Deshmukh, M., 2005, Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous, XIAP. *J. Cell Biol*, 171, 925–930.
43. Adams, J.M. and Cory, S., 2007, The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene*, 26, 1324–1337.
44. Green, D.R., Reed, J.C., 1998, Mitochondria and apoptosis, *Science*, 281, 5381,1309–1312.
45. Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. and Nicholson, D. W., 1997, A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis, *J. Biol. Chem*, 272, 179, 07-11.
46. Stennicke, H. R., Ryan, C. A. and Salvesen, G. S., 2002 Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition, 27, 2, 94-101(8).
47. Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D. and et al., 1994, Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer, *Cell*, 78, 343-52.
48. Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., 1994, Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme, *Nature*, 370, 270-5.
49. Wang, Z.B., Liu, Y.Q., Cui, Y.F., 2005, Pathways to caspase activation, *Cell Biol Int*, 2005, 29, 489–496.
50. Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecconi, F., Youle, R.J., 2003, Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization, *EMBO J*, 22, 4385– 4399.

51. Lü, C.X., Fan, T.J., Hu, G.B., Cong, R.S., 2003, Apoptosis-inducing factor and apoptosis, *Acta Biochim Biophys Sin*, 35: 881–885.
52. Fu, Y.F. and Fan, T.J., 2002, Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 34, 389–394.
53. Cowling, V. and Downward, J., 2002, Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: Absolute requirement for removal of caspase-6 pro-domain, *Cell Death Differ*, 9, 1046–1056.
54. Jiang, X. and Wang, X., 2000, Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to apaf-1, *J Biol Chem*, 275, 31199–31203,
55. Shi, J. and Le Maguer, M., 2000, Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 40, 1-42.
56. Bhuvaneswari, V., and Nagini, S., 2005, Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent, *Curr.Med.Chem.Anti.-Canc.Agents*, 5, 627-635.
57. Bohm V, Frohlich K, Bitsch R., 2003, Rosehip -- a "new" source of lycopene?, *Mol Aspects Med*, 6, 385-9.
58. Omoni, A.O. and Aluko, R.E., 2005, The anticarcinogenic and antiatherogenic effects of lycopene: a review, *Trends Food Sci Technol*, 16, 344–50.
59. Mohan, KVPC., Nagini, S., 2003, Dose-response effects of tomato lycopene on lipid peroxidation and enzymic antioxidants in the hamster buccal pouch carcinogenesis model, *Nutrition Research*, 10,1403-1416.
60. Rao, A. V., Agarwal, S., 2000, Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease, *J Am Coll Nutr*, 19, 563-569.
61. Lee, A., Thurnham, D.I., Chopra, M., 2000, Consumption of tomato products with olive oil but not sunflower oil increases the antioxidant activity of plasma, *Free Rad Biol Med*, 29, 1051–1055.
62. Clinton, S.K., Emenhiser, C., Schwartz, S.J., Bostwick, D.G., Williams, A.W., Moore, B.J., Erdman, J.W., 1996, Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5, 823–833.
63. Ferreira, A.L., Yeum, K.J., Liu, C., Smith, D., Krinsky, N.I., Wang, X.D., Russell, R.M., 2000, Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation, *J Nutr*, 130, 1256–1260.
64. Parker, R.S., 1996, Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEBJ*, 10, 42–51.

65. Bhuvaneswari, V., Velmurugan, B., Nagini, S., 2004, Dose-response effect of tomato paste on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis, *Journal of Experimental & Clinical Cancer*, 23,2, 241–49.
66. Velmurugan, B., Bhuvaneswari, V., Usha, K.B., Nagini, S., 2001, Prevention of N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine and saturated sodium chlorideinduced gastric carcinogenesis in Wistar rats by Lycopene, *Eur J Cancer Prev*, 11, 19–26.
67. Kucuk, O., Sarkar, F.H., Djuric, Z., Sakr, W., Pollak, M.N., Khachik, F., Banerjee, M., Bertram, J.S., Wood, D.P., Jr., 2002, Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer, *Exp Biol Med.*, 10, 881-5.
68. Obermuller-Jevic, U.C., Olano-Martin, E., Corbacho, A.M., Eiserich, J.P., van der Vliet, A., Valacchi, G., Cross, C.E., Packer, L., 2003, Lycopene inhibits the growth of normal human prostate epithelial cells in vitro, *J Nutr*, 133, 3356–3360.
69. Sahin, K., Ozercan. R., Onderci, M., Sahin, N., Gursu, M.F., Khachik, F., Sarkar, F.H., Munkarah, A., Ali-Fehmi, R., Kmat, D., Kucuk, O., 2004, Lycopene supplementantion prevents the develompment of spontaneous smooth muscle tumors of the oviduvt in japanese quail, *Nutr Cancer*, 50, 181-189.
70. Amir, H., Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy, R., Yermiahu, T., Levy, J., Sharoni, Y., 1999, Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin-D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells, *Nutr Cancer*, 33, 105–112.
71. Nahum, A., Hirsch, K., Danilenko, M., Watts, C.K., Prall, O.W., Levy, J., Sharoni, Y., 2001, Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes, *Oncogene*, 20,3428–3436.
72. Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., Beyer, E.C., 2003, Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions, *Physiol Rev*, 83, 1359–1400.
73. Heber, D. and Lu, Q.-Y, 2002, Overview of mechanisms of action of Lycopene, *Exp.Biol.Med.*, 227, 920-923.
74. Rao, A.V., and Agarwal, S., 1999, Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases, A review, *Nutrition Research*, 2, 305-323.
75. Furstenberger, G., Senn, H.J., 2002, Insulin-like growth factors and cancer, *Lancet Oncol*, 3, 298–302.

76. Karas, M., Amir, H., Fishman, D., Danilenko, M., Segal, S., Nahum, A., Koifmann, A., Giat, Y., Levy, J., Sharoni, Y., 2000, Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Cancer* 36, 101–111.
77. Siler, U., Barella, L., Spitzer, V., Schnorr, J., Lein, M., Goralczyk, R., Wertz, K., 2004, Lycopene and vitamin E interfere with autocrine/paracrine loops in the Dunning prostate cancer model, *FASEB J*, 03-1116.
78. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagan, T.M., 1993, Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 7915–7922.
79. Halliwell, B., 1994, Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence?, *Lancet*, 344, 721–724.
80. Ames, B., Gold, L.S., Willett, W.C., 1995, Causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 5258–5265.
81. Harats, D., Chevion, S., Nahir, M., Norman, Y., Sagee, O., Berry, E., 1998, Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamin C and E in vivo, *Am J Clin Nutr*, 67, 240–245.
82. Matos, H.R., Capelozzi, V.L., Gomes, O.F., Mascio, P.D., Medeiros, M.H., 2001, Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate, *Arch Biochem Biophys*, 396, 171–177.52.
83. Matos, H.R., Di Mascio, P., Medeiros, M.H., 2000, Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture, *Arch Biochem Biophys*, 383, 56–59.
84. Porrini, M., Riso, P., 2000, Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption, *J Nutr*, 130, 189–192.
85. Bowen, P., Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., Sharifi, R., Ghosh, L., Kim, H.S., Christov-Tzelkov, K., Van Bremen, R., 2002, Tomato sauce supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation and modulation of biomarkers of carcinogenesis, *Exp Biol Med*, 227, 886–893.
86. Wertz, K., Siler, U., Goralczyk, R., 2004, Lycopene: modes of action to promote prostate health, *Arch of Biochem And Biophys*, 430, 127-134.

87. Tuzcu, M., 2004, Deneysel olarak oluşturulan diyabetik ratlarda hipokampus ve beyin korteksinden n-cam protein ekspresyonu ve buna melatonin ve vitamin E'nin etkisi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(259), 680-5.
88. Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(259), 680-5.
89. Karatepe, M., 2004, Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC–UV, *Lcgc North America*, 22, 4, 362-365.
90. SAS, 2002, SAS® User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc, Cary, NC.
91. Kundu, J.K., Shin, Y.K., Surh, Y.J., 2006, Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin *in vivo*: NF- κ B and AP-1 as prime targets, *Biochemical Pharmacology*, 72 (11), 1506–1515.
92. Sun, S.Y., Hail, N., Lotan, R., 2004, Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention, *J Natl Cancer Inst*, 96, 662–672.
93. Steele, V.E., 2003, Current mechanistic approaches to the chemoprevention of cancer, *J Biochem Mol Biol*, 36, 78–81.
94. Baliga, M.S., Meleth, S., Katiyar, S.K., 2005, Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells *in-vitro* and *in-vivo* systems, *Clinical Cancer Research*, 11 5, 1918–1927.
95. Huang, C., Li, J., Ma, W.Y., Dong, Z., 1999, JNK activation is required for JB6 cell transformation induced by tumor necrosis factor- α but not by 12-Otetradecanoylphorbol- 13-acetate, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 42, 29672–29676A.
96. Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M.D. and Daniel H., 2000, Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in colon carcinoma cell, *Cancer Res*, 60, 3823–3831.
97. Pillai, G.R., Srivastava, A.S., Hassanein, T.I., Chauhan, D.P., Carrier, E., 2004, Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin, *Cancer Lett*, 208, 163–170.
98. Zhang, S., Cao, H.J., Davis, F.B., Tang, H.Y., Davis, P. J. and Lin, H-Y., 2004, Oestrogen inhibits resveratrol-induced post-translational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells, *Br J Cancer*, 91, 178–185.

99. Bertram, J.S., Pung, A., Churly, M., Kappock, J., Wilkins, L. R. and Cooney, R. V., 1991, Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation, *Carcinogenesis*, 12, 671–678.
100. Cohen, L.A., 2002, A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene and cancer chemoprevention, *Exp Biol Med*, 227, 864–868.
101. Baell, J.B., Huang, D.C., 2002, Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs, *Biochemical Pharmacology*, 64, 5-6, 851–863.
102. Goodsell, D.S., 2002. The molecular perspective: Bcl-2 and apoptosis, *Stem Cells*, 20, 4, 355–356.
103. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D., 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*, 275 (5303), 1132–1136.
104. Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 1995, Multiple Bcl-2 family members demonstrates selective dimerizations with Bax, *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 92 (17), 7834–7838.
105. Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J., 1997, Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis, *The Journal of Cell Biology*, 139 (5), 1281–1292.
106. Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998, Caspases: enemies within, *Science* 28 (5381), 1312–1316.
107. Kalra, N., Roy, P., Prasad, S., Shukla, Y., 2008, Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis, *Life Sciences*, 82, 348–358.
108. Liu, J.R., Dong, H.W., Chen, B.Q., Zhao, P. R., Liu, H., 2009, Fresh Apples Suppress Mammary Carcinogenesis and Proliferative Activity and Induce Apoptosis in Mammary Tumors of the Sprague-Dawley Rat, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 297–304.
109. Chaudhary, S.C., Alam, M. S., Siddiqui, M. S., Athar, M., 2009, Chemopreventive effect of farnesol on DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis: Involvement of inflammation, Ras-ERK pathway and apoptosis, *Life Sci*, Article In Pres.
110. Bhattacharyya, S. S., Paul, S., Mandal, S. K., Banerjee, A., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A. R., 2009, A synthetic coumarin (4-Methyl-7 hydroxy coumarin) has anti-cancer potentials against DMBA-induced skin cancer in mice, *European Journal of Pharmacology*, 614, 128–136.

111. Gigantia, D. M., Parkina, D. R., Bennetta, K.K., Lub, Y., Deckerb, R. W., Niehansa, G. A., and Bliss R. L., 2007, Suppression of mammary gland carcinogenesis by post-initiation treatment of rats with tamoxifen or indole-3-carbinol or their combination, *European Journal of Cancer Prevention*, 16, 130–141.
112. Kundoor, V., Zhang, X., Bommareddy, A., Khalifa, S., Fahmy, H., Dwivedi, C., 2007, Chemopreventive Effects of Sarcotriol on Ultraviolet B-induced Skin Tumor Development in SKH-1 Hairless Mice, *Marine Drugs*, 5, 197–207.
113. Puthalakath, H. and Strasser, A., 2002, Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins, *Cell Death Differ* 9, 505–512.
114. Wang, X., 2001, The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes Dev*, 15(22), 2922–2933.
115. Huang, Y.L., Sheu, J.Y Lin, T.H., 1999, Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer, *Clin. Biochem*, 32, 31–36.
116. Khanzode, S.S., Muddeshwar, M.G., Khanzode, S.D., Dakhale, G.N., 2004, Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer, *Free Rad. Res.*, 38, 81–85.
117. Kolanjiappan, K., Manoharan, S., Kayalvizhi, M., 2002, Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients, *Clin. Chim. Acta*, 326, 143–149.
118. Arulkumarana, S., Ramprasatha, V.R., Shanthib P., Sachdanandam P., 2007, Alteration of DMBA-induced oxidative stress by additive action of a modified indigenous preparation—Kalpaamruthaa, *Chemico-Biological Interactions*, 167, 99–106.
119. Bishayee, A., Oinam, S., Basu, M. and Chatterjee, M., 2000, Vanadium chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinogenesis: probable involvement of representative hepatic phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes, *Breast Cancer Research and Treatment*, 63, 133–145.
120. Sahin, K., Ozercan, R., Onderci, M., Sahin, N., Khachik, F., Seren, S. and Kucuk, O., 2007, Dietary Tomato Powder Supplementation in the Prevention of Leiomyoma of the Oviduct in the Japanese Quail, *Nutrition And Cancer*, 59(1), 70–75.
121. Dringen, R., 2000, Metabolism and functions of glutathione in brain, *Progress neurobiology* 62, 649–71.

122. Kettler, B., 1998, Glutathione-S-transferase and prevention of cellular free radical damage, *Free Radic Res*, 28,647–658.
123. Mishra, P., Kar, A., Kale, R. K., 2009, Prevention of chemically induced mammary tumorigenesis by daidzein in pre-pubertal rats: the role of peroxidative damage and antioxidative enzymes, *Mol Cell Biochem*, 325,149–157.
124. Choi, E. J., 2008, Antioxidative effects of hesperetin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced oxidative stress in mice, *Life Sciences*, 82, 1059–1064.

ÖZGEÇMİŞ

01.11.1983 tarihinde Adana'nın Feke ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Adana'da tamamladıktan sonra 2002 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi ve 2006 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2007 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalında da Yüksek Lisans eğitimine başladı.

2009 yılı Ocak ayında Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümün de Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı ve halen aynı görevi sürdürmekte.