



T.C.

ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

SAPIENİK ASİDİN MELANOMA HÜCRELERİNDE MAPK
YOLAĞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Merve SOYUĞUR

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ertan KÜÇÜKSAYAN

ALANYA
2021

MERVE SOYUĞUR Sapienik Asidin Melanoma Hücrelerinde MAPK
Yolağına Etkisinin Araştırılması

ALANYA 2021

T.C.
ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SAPIENİK ASİDİN MELANOMA HÜCRELERİNDE MAPK YOLAĞINA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Merve SOYUĞUR
Anabilim dalı: Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Program adı: Moleküler Tıp

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi ERTAN KÜÇÜKSAYAN

Bu tez çalışması ALKÜ-BAP Komisyonunca kabul edilen 2019-04-01-MAP01 no'lu proje kapsamında ve TÜBİTAK tarafında kabul edilen (Proje No. 116S475) kapsamında desteklenmiştir.

ALANYA

2021

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Merve SOYUĞUR

TEŞEKKÜR SAYFASI

Yüksek lisans eğitim sürecimde bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, beni olumsuzluklara karşı gayretlendiren, tez çalışmam için bütün imkân ve olanaklarını tüm cömertliğiyle sunan, emeği ve özverisi ile her zaman destek olan danışmanım sayın hocam ERTAN KÜÇÜKSAYAN'a,

Yüksek lisans sürecimin başlamasına vesile olan, bu sürecin içindeki zorluklara karşı çözüm bulmak için emeği ve özverisini ortaya koyan, bilgi ve tecrübesini en güzel şekilde aktaran, ilgisini ve sevgisini hissettiğim sayın hocam ASLINUR SIRCAN KÜÇÜKSAYAN'a,

Bilgi paylaşımları ve desteklerinden dolayı değerli bölüm hocalarıma,

İhtiyaç duyduğum her an desteklerini hissettiklerim dostlarım ve çalışma arkadaşlarıma (Yağmur DAKAK, Fatma İŐLER, Seda YAVUZARSLAN, Sümeyra UTKU, Gülçin ASLAN, Kazime AYDOĞAN, Fatma Zehra KARAKUZU, Zehra KARAARSLAN),

Son olarak hayatım boyunca özverisini tüm kalpleriyle veren, bana olan inançlarıyla ilham kaynağım olan, maddi manevi her zaman desteklerini hissettiğim, zorluklara karşı cesaretlendiren, ömür boyu şükürümü arttıran, sonsuz emekleri ve fedakarlıkları için annem YELİZ SOYUĞUR, babam NAİL SOYUĞUR ve kardeşlerim MELİKE KÜBRA ve CANSU SOYUĞUR'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

SAPİENİK ASİDİN MELANOMA HÜCRELERİNDE MAPK YOLAĞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MERVE SOYUĞUR

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü,

Temmuz, 2021 (76 Sayfa)

Agresif bir cilt kanseri türü olan melanoma, morbidite ve mortalitenin önemli bir nedeni olup insidansı dünya çapında gittikçe artmaktadır. Kanser hücrelerindeki sinyal yollarının aydınlatılması uygulanacak tedavilerin olumlu ve olumsuz yönlerini anlamada oldukça yardımcı olmaktadır. Sinyal iletimi sürecinde membran lipidlerinin önemli katkıları olduğu kabul edilmiştir. Membrandaki yağ asitlerinin miktarı, akışkanlığı etkilediği gibi hücre içi yollarda rol alan membran proteinlerinin aktivasyonunu da değiştirebilmektedir. MAPK sinyal iletim yolları çeşitli çevresel sinyallere yanıt olarak proliferasyon, farklılaşma, apoptozis, hücre-hücre adezyonu, inflamasyon, metastaz ve invazyon gibi farklı hücre fonksiyonları düzenleyen ve kanser araştırmalarında hedeflenen başlıca yollardandır. Yapılan çalışmalarda, cildin sebumunda doğal olarak üretilen sapienik asidin (SA) kanser hücrelerinin membran veziküllerindeki miktarının normal hücrelere göre arttığı belirtilmiştir. Cilt sebumunda doğal olarak bulunmasına rağmen, literatürde SA'nın cilt kanserinde yer alan yollar üzerindeki etkisine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle SA'in eksojen olarak melanom hücre hattına verilmesi ile MAPK yolağına etkisini araştırmayı hedefledik.

SA'nın MAPK yolağına etkilerini incelemek için malign melanom karakterli A375 hücre dizileri kullanıldı. SA'nın A375 hücre dizilerindeki sitotoksik etkisi MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid] deneyi ile belirlendi. SA'nın değişen konsantrasyonları ile hücreler farklı zaman aralıklarında inkübe edilerek, sitotoksikite testi ile hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu (IC₅₀ değeri) saptandı ve hücre üzerindeki etkilerini görebilmek için inverted mikroskopla hücrelerin fotoğrafları çekildi. MM olan A375 hücre dizilerinde 0 dk, 30 dk, 1, 2 ve 3 saatlik kısa inkübasyonların yanında 24 ve 48 saat inkübasyonlar yapıldıktan sonra

total protein ölçümü Bradford yöntemi ile yapıldı. SA'in hücre membranındaki epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) etkisi ile MAPK yolağındaki bir dizi etkisi sonucunda proliferatif etkileri araştırıldı. EGFR ile MAPK yolağındaki spesifik protein bantları Western Blot analizi ile elde edildi. SA'nın lipid peroksidasyonu sonucu yan ürün olarak ortaya çıkan ve oksidatif stresin büyüklüğü yansıtan malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçülmesi için TBARS kiti kullanıldı. Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri ise SOD kiti kullanılarak hesaplandı.

Çalışmamızda, uzun süreli inkübasyonlar sonucu SA'nın A375 hücrelerine sitotoksik etkileri olduğu gözlenmiştir. Kısa ve uzun süreli inkübasyonlar sonucu ise SA'nın A375 hücrelerinde MAPK yolağını uyardığı belirlenmiştir. Biyoaktif lipidlerin kanser prognozunda MAPK yolağına zıt yönlü iki etkisinin barındırdığını kanıtlamaktadır. Sapienik asidin belirlenen doz ve zaman aralıklarında farklı etkilerinin olması sebebiyle kemoterapötik tedavilerin değerlendirmesi açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Sapienik Asit; Malign Melanoma; MAPK Yolağı; Oksidatif Stres; Lipid Peroksidasyonu

ABSTRACT

EFFECTS OF SAPIENIC ACID ON MAPK PATHWAY IN MELANOMA CELLS

Merve SOYUĞUR

Department of Molecular Medicine

Graduate School of Alanya Alaaddin Keykubat University,

July, 2021

Melanoma, an aggressive form of skin cancer, is an important cause of morbidity and mortality, and its incidence is increasing worldwide. Clarifying the signaling pathways in cancer cells is very helpful in understanding the positive and negative aspects of the treatments to be applied. It has been accepted that membrane lipids have important contributions in the signal transduction process. The amount of fatty acids in the membrane can affect the fluidity as well as change the activation of membrane proteins involved in intracellular pathways. MAPK signal transduction pathways regulate different cellular functions such as proliferation, differentiation, apoptosis, cell-cell adhesion, inflammation, metastasis and invasion in response to various environmental signals and are the main pathways targeted in cancer research. Studies have shown that the amount of sapienic acid (SA), which is naturally produced in the sebum of the skin, in the membrane vesicles of cancer cells is increased compared to normal cells. Although it is naturally found in skin sebum, there is no study in the literature on the effect of SA on the pathways involved in skin cancer. For this reason, we aimed to investigate the effect of SA on the MAPK pathway by exogenous administration to a melanoma cell line.

A375 cell lines with malignant melanoma character were used to examine the effects of SA on the MAPK pathway. The cytotoxic effect of SA on A375 cell lines was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide] assay. Cells were incubated at different time intervals with varying concentrations of SA, the concentration that killed 50% of the cells (IC₅₀ value) was determined by cytotoxicity test, and the cells were photographed with an inverted microscope to see their effects on the cell. In A375 cell lines with MM, short incubations of 0 min, 30 min, 1, 2 and 3 hours, as well as 24 and 48 hours incubations, total protein measurement was made by Bradford method. The proliferative effects of SA were investigated as a result of the epidermal growth factor receptor (EGFR) effect

on the cell membrane and a series of effects on the MAPK pathway. Specific protein bands in the MAPK pathway with EGFR were obtained by Western Blot analysis. The TBARS kit was used to measure the level of malondialdehyde (MDA), which is a by-product of lipid peroxidation of SA and reflects the magnitude of oxidative stress. Superoxide Dismutase (SOD) enzyme activities were calculated using the SOD kit.

In our study, it was observed that SA had cytotoxic effects on A375 cells as a result of long-term incubations. As a result of short and long-term incubations, it was determined that SA stimulated the MAPK pathway in A375 cells. It proves that bioactive lipids have two opposing effects on the MAPK pathway in cancer prognosis. It is important for the evaluation of chemotherapeutic treatments because sapienic acid has different effects in determined doses and time intervals.

Keywords: Sapienic Acid; Malignant Melanoma; MAPK Pathway; Oxidative Stress; Lipid Peroxidation

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	i
TEŞEKKÜR SAYFASI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR	4
2.1. Malign Melanoma	4
2.2. Melanom Epidemiyolojisi.....	5
2.3. A375 Malign Melanom Hücre Hatları	6
2.5. Risk faktörleri.....	6
2.5.1. Etnik köken.....	7
2.5.2. Coğrafya	7
2.5.3. Yaş ve cinsiyet.....	7
2.6. Tanı ve Tedavi.....	8
2.7. Yağ Asitleri	9
2.7.1. Hücre zarındaki yağ asitlerinin rolü	10
2.8. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	11
2.8.1. ROS kaynakları	11
2.8.2. ROS ve kanser ilişkisi.....	12
2.9. Lipid Peroksidasyonu.....	12
2.9.1. Kanser ile lipid peroksidasyon ilişkisi.....	14
2.10. Sapienik Asit	15
2.10.1. Sapienik asidin biyolojik önemi	15
2.10.2. Sapienik asit biyosentezi	16
2.11. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Yolağı	18
2.11.1. p38-MAPK yolağı	19
2.11.2. ERK1/2-MAPK yolağı	20
2.11.2.1. ERK1/2 ile kanser ilişkisi	21

2.11.3. JNK-MAPK yolağı.....	23
2.11.3.1. JNK yolunun aşağı regülasyonu	23
2.11.3.2. JNK/SAPK ile kanser ilişkisi.....	23
2.12. EGFR-MAPK Kanser İlişkisi	24
2.13. Lipidlerin Reseptörler ile İlişkisi	25
3. YÖNTEM	27
3.1. Hücre Kültür Çalışmaları	27
3.1.1. Hücre dizisi ve ilaçlar.....	27
3.1.1.1. Hücre kültürü ve hücrelerin deneylere hazırlanması için gerekli çözeltiler ..	27
3.1.2. Hücrelerin çoğaltılması	27
3.1.3. Hücrelerin dondurulması.....	28
3.1.4. Hücrelerin çözülmesi.....	28
3.2. Sapienik Asidin Sitotoksisite Çalışması	28
3.2.1. Hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyonun MTT kiti ile belirlenmesi.....	28
3.2.1.1. Prensiş	29
3.2.1.2. Reaktifler	29
3.2.1.3. Deneyin yapılışı	29
3.3. Sapienik Asidin A375 Hücreleri ile İnkübasyonu ve Hücrelerin Toplanması30	
3.3.1. Gruplandırma.....	30
3.3.2. Deneyin yapılışı.....	30
3.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	30
3.4.1. Prensiş	30
3.4.2. Reaktifler	31
3.4.3. Gruplandırma.....	31
3.4.4. Deneyin yapılışı.....	31
3.5. Western Blot Protein Tayin Yöntemi.....	32
3.5.1. Prensiş	32
3.5.2. Reaktifler	32
3.5.3. Gruplandırma.....	33
3.5.4. Deneyin yapılışı.....	33
3.5.4.1. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve transferi	33
3.6. Lipid Peroksidasyon Ölçümü.....	34
3.6.1. Prensiş	34

3.6.2. Reaktifler	35
3.6.3. Gruplandırma.....	35
3.6.4. Deneyin yapılışı.....	35
3.7. Süperoksit ismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi	36
3.7.1. Prensiip	36
3.7.2. Gruplandırma.....	37
3.7.3. Reaktifler	37
3.7.4. Deneyin yapılışı.....	37
3.8. İstatistiksel analiz	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Sitotoksisite Bulguları.....	39
4.1.1. A375 hücrelerinde sapienik asidin sitotoksisitesi	39
4.1.2. A375 hücrelerinde sapienik asidin etkisinin mikroskopla gözlenmesi ...	40
4.2. Bradford Protein Tayin Yöntemi ile Total Protein Ölçümü.....	41
4.3. Western Blot Bulguları	42
4.4. Lipid Peroksidasyon Bulguları.....	53
4.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Bulguları	54
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	64
7. KAYNAKÇA.....	67
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Protein Standart çözeltisi hazırlama tablosu.....	31
---	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Doymuş yağ asidi (Saturated fatty acids, SFA)	9
Şekil 2.2 Tekli doymamış yağ asidi (MUFA)	10
Şekil 2.3 Çoklu doymamış yağ asidi (PUFA)	10
Şekil 2.4 Lipid peroksidasyon şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.5 Oksidatif Denge (Özcan, Erdal et al. 2015).	14
Şekil 2.6 Sapienik asidin çizgi formülü.....	16
Şekil 2.7 Sapienik asit ve diğer lipitlerin biyosentezi	17
Şekil 2.8 MAPK yollarının organizasyonu.....	18
Şekil 2.9 p38'e bağlı hücreyel yollar	19
Şekil 2.10 p38 MAPK'nın tümörjenezdeki ikili rolü.....	20
Şekil 2.11 EGFR-MAPK'nın tümörjenezdeki rolü (Roberts and Der 2007).....	25
Şekil 3.1 MDA-TBARS reaksiyon şeması (Aguilar Diaz De Leon and Borges 2020).	35
Şekil 3.2 Süperoksit'in ve SOD'un reaksiyon şeması	36
Şekil 4.1 Farklı dozlardaki sapienik asidin A375 hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi	39
Şekil 4.2 Farklı dozlardaki Sapienik asidin A375 hücrelerinde 48 saat için % canlılık üzerine etkisi	40
Şekil 4.3 Farklı dozlardaki Sapienik asidin A375 hücrelerinde 24 saat sonunda 10X mikroskop görüntüleri.....	40
Şekil 4.4 Farklı dozlardaki Sapienik asidin A375 hücrelerinde 48 saat sonunda 10X mikroskop görüntüleri.....	41
Şekil 4.5 Bradford yöntemiyle standart çizilen absorbansa karşılık konsantrasyon grafiği.....	41
Şekil 4.6 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyon ile GAPDH, EGFR, p-EGFR, p38, p-p38 ve p21 proteinlerinin western blot görüntüleri. Üzerindeki sayısal değerler kontrole göre ekspresyon miktarlarını kat miktarını göstermektedir.	43
Şekil 4.7 Sapienik Asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 24 ve 48 saat inkübasyon ile β-actin, EGFR, p-EGFR, MEK, p-MEK, ERK1/2, p-ERK1/2, p38, p-p38 ve p21 proteinlerinin western blot görüntüleri. Üzerindeki sayısal değerler kontrole göre ekspresyon miktarlarını kat miktarını göstermektedir.	44
Şekil 4.8 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine GAPDH proteini üzerine etkisi.	45
Şekil 4.9 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine p-EGFR proteini aktivasyonu üzerine etkisi.....	46

Şekil 4.10 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine p-p38 proteini aktivasyonu üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.11 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte β-actin proteini üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.12 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte p-EGFR proteini aktivasyonu üzerine etkisi.	49
Şekil 4.13 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte p-MEK proteini aktivasyonu üzerine etkisi.	50
Şekil 4.14 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte p-ERK proteini aktivasyonu üzerine etkisi.	51
Şekil 4.15 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte p-p38 proteini aktivasyonu üzerine etkisi.	52
Şekil 4.16 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte p21 proteini üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.17 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 0-3 saat inkübasyonlarına MDA düzeyleri üzerine etkisi.	54
Şekil 4.18 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24-48 saat inkübasyonlarına MDA düzeyleri üzerine etkisi.	54
Şekil 4.19 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 0-3 saat inkübasyonlarına SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.20 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 0-3 saat inkübasyonlarına SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.21 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 0-3 saat inkübasyonlarının OSİ'ye etkisi	56
Şekil 4.22 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24-48 saat inkübasyonlarının OSİ'ye etkisi	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
δ	Delta
p	Fosfo
γ	Gamma
C	Karbon
kDa	Kilodalton
L	Litre
μ	Mikro
M	Molarite
n	Nano
U	Ünite
g	Kütleçekimsel kuvvet

Kısaltmalar

6-HA	cis-6-heksadekenoik asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMPK	Adenosin Monofosfat ile Aktive Olan Protein Kinaz
APS	Amonyum persülfat
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
BSA	Sığır Serum Albumin
Cdk	Sikline bağımlı kinaz
CPPA	Commassie Plus Protein Assay

CREP	cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein
DHA	Dokosahekzaenoik asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTPA	Dietilentriaminpentaasetik Asit
ECL	Gelişmiş Kemilüminesans
ECM	Ekstrasellüler Matriksi
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
EPA	Eikozopentaenoik asit
FADS2	Yağ asidi desaturaz 2
FAS	Yağ Asidi Sentaz
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FFA	Serbest Yağ Asidi
FFAR	Serbest yağ asidi reseptörleri
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GTP	Guanin Trifosfat
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HRP	Horseradish Peroksidaz
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
IL-1	İnterlökin-1
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
MAGS	Melanoma Agresiflik Skoru

MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MC1R	Melanokortin reseptörü 1
MDA	Malondialdehitin
MM	Malign Melanoma
MSH	Melanosit uyarıcı hormonu
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid
MUFA	Tekli doymamış yağ asitleri
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
PA	Palmitik Asit
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCNA	Çoğalan Hücre Nükleer Antijeni
PI3K	Fosfoinositid 3-kinaz
PIC	Proteaz İnhibitör Kokteyli
POA	Palmitoleik asit
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
PVDF	Poliviniliden diflorür
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon tahlil tamponu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Reseptörü Tirozin Kinazın
SA	Sapienik Asit
SAPK	Stresle Aktive Olan Protein Kinaz
SCD	Stearoil-CoA desatüraz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SFA	Doymuş Yağ Asidi
SOD	Süperoksit dismutaz
STAT	Sinyal İleticisi ve Bir Transkripsiyon Aktivatörü

T	Tween 20
TBA	Tiyobarbütirik Asit
TBARS	Tiobarbitürik asit reaktif testi
TBS	Tris Baz Çözeltilisi
TMBS1	Tubeimoside I
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
UPS	Ultra Saf su
UV	Ultraviyole



1. GİRİŞ

Kanser insanlık tarihi boyunca karşılaşılan, 20.ve 21. yüzyılda sürekli artan bir insidansla daha da yayılmaktadır. Kanser, organlarda çevresel ve genetik koşulların etkisi ile hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu ortaya çıkan tedavisi ve yaklaşımı birbirinden farklı olan kompleks bir hastalıktır. 100'den fazla kanser türü olduğu bilinmektedir. Kanser tedavileri için standart tedavilerin yanı sıra kişisel tedaviye de gereksinim duyulmaktadır. Bilinen kanser tedavileri kemoterapi, radyoterapi, cerrahi müdahalelerin yanında gen terapileri ve hedeflenmiş tedaviler günümüzde uygulanmaya başlanmıştır (1).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre; dünyada melanoma ve diğer deri kanseri türlerinden 2015 yılında 96,642 kişi ölmüştür ve 2030 yılında ise 136,175 kişinin öleceği tahmin edilmektedir (2). Kutanöz malign melanom, yüksek metastatik potansiyeli nedeniyle cilt kanserinin en ölümcül türlerinden biridir. Tüm cilt kanserleri türlerinin %4'ünü oluşturur ancak ölümlerin neredeyse yarısına sebep olmaktadır. Yeni melanom vakaları için insidans oranları 2008-2018 yılları arasında ortalama %1.5 artmıştır (3). Deri kanserine bağlı ölümlerin büyük çoğunluğu (%75) melanom nedeniyledir (4). Dünya çapında kutanöz melanom insidansı, diğer kanser türlerine kıyasla her yıl daha hızlı bir oranda artmaktadır (5). Malign melanom (MM) tanısı konmuş toplamda 324,635 yeni vaka olduğu DSÖ'nün 2020 yılı verilerine girmiştir. Bu vakaların 57,043'ü ölümle sonuçlanmıştır (6).

Epidemiyolojik verilere göre melanom insidansında önemli bir cinsiyet farklılığı olduğu belirtilmiştir. Son on yılda daha yüksek risk altında görünen genç kadınlar (≤ 39 yaş) dışında, tüm yaş kategorilerindeki kadınlara kıyasla erkekler arasında daha hızlı artmaktadır. Bu gözlemlere paralel olarak, genç kadınlarda (20-45 yaş) biraz daha yüksek melanom oranları bildirilmiştir ve 45 yaşından sonra azalmaktadır. Öte yandan erkeklerde melanom insidansı 50 yaşından sonra giderek artmaktadır (7).

Deri kanserleri (bazal hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinom) tüm insan kanserlerinin en yaygın şeklidir ve erken teşhis edilirse cilt kanseri neredeyse %100 tedavi edilebilir. Kutanöz MM tahminen %60-70 ultraviyole (UV) radyasyona bağlı geliştiği düşünülmektedir (8). Tedavide diğer kanser türlerinde olduğu gibi erken tanı önemlidir. Erken tanı ile %83 oranında tedavi edilebilmektedir. Melanom tedavi yöntemi, kanserin evresi ve derecesine göre değişir. Tedavide cerrahi eksizyon, kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri mevcuttur (9).

Tüm kanserlerin ortak özelliği olan hücrel çoğalma, zararın ve sinyal moleküllerinin sentezi için yağ asitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser hücrelerinde yağ asidi metabolizmasındaki değişiklikler daha az ilgi görmüştür ancak bu ilgi zamanla artmaktadır. Alifatik karboksilik asitler olan yağ asitleri; canlı sistemlerde taşıyıcı misellerde, hücrelerin ve organellerin membran yapısında, hücre içi sinyalizasyonunda, gen ekspresyonunda ve regülasyonunda birçok görev üstlenmektedir (10, 11).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrede lipid peroksidasyona yol açtığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu membran bütünlüğünün ve hücre homeostazının bozulmasına sebep olmaktadır. Bu durum da membrandaki reseptör ve sinyal iletiminde sorunlara yol açabilir. Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) hücre dışı uyaranlar ile sinyal iletimi sonucu çoğalma, farklılaşma, apoptozis gibi farklı cevaplar üreten anahtar bir görev üstlenmiştir. Birçok kanser türü ile ilişkilendirilen p38/MAPK yolunun metastatik melanomda da yapılan çalışmalarla vurgulanmıştır. Çeşitli yollarla inhibisyonu metastatik aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (12, 13). Melanom malignitesinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve terapötik seçeneklerin iyileştirilmesi açısından bu yöndeki araştırmaların önemli bir yeri vardır.

Cilt doğal olarak cildi dış etkilerden koruyan yağ asidi açısından zengin sebum salgılar. Zengin yağ asidi içeriğine sahip cilt sebumunda 16 karbonlu tekli çift bağa sahip doymamış yağ asidi ve cis formunda olan sapienik asidin (SA) malign melanom karakterli A375 hücre dizilerinde MAPK yolağına olan etkileri incelendi. SA'nın cilt kanseri hücre dizilerindeki sitotoksik etkisi MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid] deneyi ile belirlendi. SA'nın değişen konsantrasyonları ile hücreler farklı zaman aralıklarında inkübe edilerek, sitotoksikite testi ile hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu (IC₅₀ değeri) saptandı ve hücre üzerindeki etkilerini görebilmek için inverted mikroskopla hücrelerin fotoğrafları çekildi. MM olan A375 hücre dizilerinde 0 dk, 30 dk, 1, 2 ve 3 saatlik kısa inkübasyonların yanında 24 ve 48 saat inkübasyonlar yapıldıktan sonra total protein ölçümü Bradford yöntemi ile yapıldı. SA'nın hücre membranındaki epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) etkisi ile MAPK yolağındaki bir dizi etkisi sonucunda proliferatif etkileri araştırıldı. Western Blot analizi EGFR ile MAPK yolağındaki spesifik protein bantlarının kantitatif sonuçları elde edildi. SA'in lipid peroksidasyonu sonucu yan ürün olarak malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçülmesi ile oksidatif stresin büyüklüğü MDA kiti ile araştırıldı. Bunun yanı sıra reaktif oksijen türlerinin yol açtığı hasarı engellemek üzere Süperoksit Dismutaz (SOD) enziminin etkinliği SOD kiti ile belirlendi.

Literatürde cilt sebumunda bulunan SA'in melanoma hücre dizileri üzerindeki etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bulgularımız MM'de SA'nın antiproliferatif ve MAPK yolaklarını tetikleyebileceğini düşündürmektedir. Bu da ciltte doğal olarak bulunan yağ asitlerinin kanser hücreleri üzerindeki koruyucu etkileri hakkında ipuçları verebilir.



2. LİTERATÜR

2.1. Malign Melanoma

Kanser, küresel olarak ölüm oranlarına bakıldığında tüm hastalıklar içinde ikinci sırada yer almaktadır. Dünya popülasyonu büyüdükçe ve riski arttıran yaşam tarzını benimsedikçe görülme sıklığının hızla artması beklenmektedir. Yaş, ırk, cinsiyet ve genetik faktörlerin yanı sıra stres, sigara ve alkol kullanımları, beslenme, kronik hastalıklar, bağışıklık sistemi baskılayan ilaç kullanımı gibi faktörler kanser riskini artırmaktadır. Bunun yanında hava kirliliği ve UV radyasyon gibi çevresel faktörler de kanseri tetiklemektedir. DSÖ verilerine göre 2018 yılında 9,6 milyon ölüm yaşanmıştır ve günümüzde her 6 ölümden birinin nedeni kanserdir (14).

Tüm bedenimizi saran derimiz vücudumuzdaki en büyük organ olup vücudumuzu dış etkilerden koruyan bir kalkan görevi üstlenmektedir. Birçok çevresel faktörlerle ilk karşılaşan derimiz çok fazla da risk altındadır. Bunlardan birisi her yıl artışta olan kanser hastalığıdır. Malign gelişim için en önemli çevresel risk faktörü genotoksik etkileri nedeniyle UV ışınlarına maruz kalmaktır.

Melanomlar, melanositlerden köken alan kötü huylu tümörlerdir ve erken metastaz gösterme eğilimindedirler. Agresif bir cilt kanseri türü olan malign melanom cilt kanserinin en ölümcül şeklidir. Morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir ve melanom insidansı dünya çapında gittikçe artmaktadır. Günümüzde cerrahi haricinde tatmin edici tedavisi bulunmamaktadır (15). Melanom, her yıl teşhis edilen genel cilt kanserlerinin %3'ünü temsil etmektedir. Ancak genel cilt kanserlerine göre ölüm oranı %75'tir (16, 17).

Melanositler, esas olarak bazal epidermiste ve kıl foliküllerinde, mukozal yüzeylerde, meninksler boyunca ve gözün koroid tabakasında bulunabilen nöral krest kaynaklı hücrelerdir (18). UV kaynaklı DNA hasarına yanıt olarak, deri keratinositleri, melanosit üretimi arttıracak olan uyarıcı hormonu tetikler. Melanokortin reseptörü 1'i (MC1R) bağlayan melanosit uyarıcı hormonu (MSH) melanositlerin melanin pigmenti üretimini artırır. Melanin pigmenti UV radyasyonu için bir kalkan görevi görür, böylece daha fazla DNA değişikliğini önler. Kontrolsüz artan bu uyarılma sonucunda melanoma ortaya çıkmaktadır (19).

Melanositler melanin pigmentini üretmektedir ve epidermisin dışında gözler, meninks, yemek borusu ve mukoza zarları gibi diğer deri dışı pigment içeren bölgelerde de bulunmaktadır. Bu nedenle, melanomun üç alt tipi karakterize edilebilir: epidermisteki

melanositlerden kaynaklanan kutanöz melanom (en yaygın olanı), mukoza zarlarında bulunan melanositlerden kaynaklanan mukozal melanom ve oküler stromada bulunan melanositlerden kaynaklanan uveal melanom (20). Melanositlerin kötü huylu tümörü olan MM'nin en önemli yerleşim yeri deridir ancak, nadiren de olsa meninks, mukoza, göz ve iç organlarda da görülebilir.

2.2. Melanom Epidemiyolojisi

Yirmi birinci yüzyılın başında melanom, potansiyel malign bir hastalık olmaya devam etmektedir. Dünya çapında melanom insidansı son yıllarda istikrarlı bir şekilde artmıştır ve en hızlı büyüyen kanserlerden biridir. Dünya'da her yıl 160.000 yeni vaka teşhis edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yaşam boyu melanom geliştirme riski 63'te 1'dir ve diğer Batı ülkelerinde benzer oranlar kaydedilmiştir. Şu anda, ABD'de her yıl yeni cilt kanseri teşhisi vakaları, diğer tüm kanser türlerinin toplamından daha fazladır (21). Yaşa göre insidans oranları son yıllarda açık tenli popülasyonların çoğunda artmaktadır; Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi bölgelerde baskın olan birçok açık tenli popülasyonda yıllık insidans %4-6 oranındadır (22).

Melanom insidansı diğer pek çok tümör tipine göre artmaya devam etmektedir. Çoğu hastada tanıdan sonra primer tümörün cerrahi eksizyonu ile tedavi edilmesine rağmen, birçok hastada metastaz gelişmektedir (23). Kafkas popülasyonlarında bu kanserin görülme sıklığı 1960'lardan itibaren artmış ve bu nedenle melanom, açık tenli popülasyonlarda en sık görülen kanserlerden biri haline gelmiştir. Melanoma erkeklerde beşinci en yaygın kanser türüdür. Birleşik Devletlerde kadınlarda en yaygın görülen altıncı kanser türü olarak kabul edilmektedir. Şu anda, 63 Amerikalı'dan 1'i yaşamları boyunca melanom geliştirmektedir. Avrupa'da, bildirilen en yüksek insidans oranları İsviçre, Norveç, İsveç ve Danimarka gibi İskandinav ülkelerinde görülmektedir. Avrupa'da insidans, Kuzey ülkelerinde en yüksek, Güney ülkelerinde en düşük oranlara sahiptir ancak, bu insidans oranları değişim göstermektedir. Türkiye'de Sağlık Bakanlığının 2016 yılı kanser istatistiklerine göre melanom görülme sıklığı 100 binde 1,7 olarak bildirilmiştir (25).

Cinsiyete bağlı olarak melanom insidansı her zaman çakışmayan sonuçlar göstermektedir. Erkeklerde melanom gelişme olasılığının kadınlara göre yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Başka çalışmalara göre ise her iki cinsiyetteki farklı prevalans yaşla bağlantılı olarak analiz edilmelidir (26). Buna göre ise melanom insidansı

kadınlarda erkeklerden daha yüksektir. Kadınlarda, 25 yaşından 50 yaşına kadar doğrusal olarak arttığı ancak daha sonra yavaşladığı görülmüştür. Yetmiş beş yaşlarında insidans, kadınlara kıyasla erkeklerde neredeyse 3 kat daha yüksektir (27, 28).

2.3. A375 Malign Melanom Hücre Hatları

Kutanöz melanom, cilt kanserinin en agresif şeklidir ve cilt kanserine bağlı ölümlerin çoğundan sorumludur. Oldukça agresif karaktere sahip A375 hücre hattı da bu sınıfa girmektedir (29). İnsan MM A375 hücre hattı üzerinde antikanser tedavileri ve kanser yolakları üzerindeki araştırmalar devam etmektedir. A375 malign melanom hücreleri, oksidatif stres dahil olmak üzere çoklu saldırılara direnç göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, insan melanoma hücre hatlarında proliferasyon, invazyon, metastaz ve bölünme süresi ölçülerek bir saldırganlık skoru (Melanoma Agresiflik Skoru: MAGS olarak adlandırılır) hesaplanmıştır. Bu çalışmada, hücreler fetal sığır serumu içermeyen medyumlarda büyütüldükten sonra kazıma testi yapılmış ve göç oranları ölçülmüştür. A375, diğer MM hücre hatlarına göre en yüksek göç oranı göstermiştir. Daha sonra invazyon analizi yapılmıştır ve A375 en yüksek invazyon potansiyeli göstermiştir. Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için A375 ve diğer melanom hücre hattı (daha az agresif olan SK-MEL-28) fetal sığır serumu varlığında; A375 hücre hattının, SK-MEL-28'e kıyasla çok daha yüksek bir hızda büyüdüğü belirlenmiştir. A375 hücre hattının hem serum yokluğuna hem de apoptotik uyarılara daha dirençli olduğu için daha yüksek malignite özelliği doğrulanmıştır (30). A375 hücre hattı hızlı melanomun evrelendirilmesinde büyüyen ve metastatik kökenli olarak adlandırılmıştır.

Tümörün hücre içi sinyal iletimi ve ilerlemesi; tümör mikro ortamını oluşturan hücre dışı matriksi çevreleyen stromal hücrelere ve salgılanan sinyal molekül bileşenlerine güçlü bir şekilde bağlıdır. Kanser hücreleri proliferasyonlarını yüksek oranda devam ettirebilmek için metabolik yolaklar ile güçlü bir bağ kurmaktadır. Yapılan bir çalışmada erken-yavaş ve metastatik-hızlı büyüme fazını temsil eden insan melanom hücrelerinin sekretomunun asetat, piruvat ve amino asit bileşimi belirlenmiştir (31).

2.5. Risk faktörleri

MM gelişiminde rol oynadığı düşünülen başlıca risk faktörleri; etnik köken, deri tipi (açık ten), coğrafi bölge, çevresel faktörler (ultraviyole maruziyeti), yaş, cinsiyet, genetik faktörler ve geçirilmiş melanom öyküsüdür (32).

2.5.1. Etnik köken

Melanom, diğer kanser gruplarına göre etnik köken açısından incelendiğinde insidans oranları farklılık göstermektedir. Kafkas kökenlilerde melanom orantısız bir artış göstermektedir. Bunun sebebi kısmen melanin oranının azlığı ile ilişkilendirilebilir. Daha açık pigmentli cilt tipleri ışık koruması azalmakta olup kansere sebebiyet vermektedir. Daha koyu pigmentli bireylerde artan melanin bariyeri, ciltten geçen hem ultraviyole (UV) A hem de B radyasyonunu azaltmaktadır (33, 34). Koyu tenli kişilerde UVB radyasyonunun epidermis tarafından emilimi %50 azalmaktadır. Ultraviyole A'nın 314 nm'de açık tenli bireylerde dermis tarafından emilimi %27 iken koyu tenli kişilerde %4'tür. Yine aynı şekilde UVA'nın 400 nm'de açık tenli bireylerde dermisten emilimi %47 olup koyu tenli bireylerde bu oran %14'e düşmektedir (35). UV radyasyonunun hem hücre ölümünü hem de cilt hücrelerinin kanser hücrelerine dönüşümünü indüklediği bilinmektedir (36, 37).

2.5.2. Coğrafya

Melanom insidansı, aynı etnik kökene sahip insanlar arasında coğrafi konuma göre değişmektedir. Coğrafyadaki değişimlerin etkisiyle UV radyasyonu da bu tüm değişkenlerden etkilenebilmektedir. Örneğin; Avustralya'da ekvatora daha yakın yaşayan ve dolayısıyla daha yüksek derecede güneşe maruz kalanlarda melanom görülme sıklığı daha yüksektir. Güney Avrupa ülkelerinde yaşayan insanların pigment yoğunluğu ve farklı güneş paternlerinden dolayı UV ışınlarının değişimiyle ilgilidir (24). Avrupa'da melanom insidansı, İskandinavya'nın kuzey ülkelerinde, İspanya ve İtalya gibi güney ülkelere göre 3-6 kat daha yüksektir. UV ışınımı daha yüksek rakımla ilişkilidir ve yükseklik farklılıklarının da melanom insidansında rol oynadığı öne sürülmüştür (38).

2.5.3. Yaş ve cinsiyet

Melanom insidansı altmışlı ve yetmişli yaşlarda istikrarlı bir şekilde yükselmektedir. Avustralya, Yeni Zelanda ve Kuzey Avrupa'daki bireyler de yüksek riskli popülasyonda görülmektedir. Bununla birlikte, 55-74 yaşları arasındaki Amerikalılar, ABD'de teşhis edilen tüm melanomların %44,9'unu oluşturmaktadır (35).

Kadın ve erkeklerde melanom görülme oranı farklıdır. Bireyin yaşı dikkate alındığında ergen ve genç erişkin kadınlar, erkeklere göre melanomaya daha duyarlıdır. Ancak, 40 yaşından sonra oranlar tersine döner ve erkeklerde melanom insidansı kadınlardan daha fazla olmaktadır. Genel olarak, erkekler melanomaya daha duyarlıdır.

Bazı araştırıcılar, erkekler arasında görülen bu artan duyarlılığın kısmen androjen kaynaklı olabileceğini öne sürmektedirler (39).

2.6. Tanı ve Tedavi

MM'nin klinik tanısı büyük çoğunlukla dermatologlar tarafından konmaktadır. Gerekli durumlarda tümörün eksizyonu ile tedavi edilmektedir. Melanom ilerledikçe ve metastazik durumlarda ameliyat artık yeterli olmaz ve hastalığın tedavisi zorlaşır. MM hastalarının tedavi sürecinde diğer kanser türlerinde olduğu gibi en önemli unsur erken tanıdır. Tedavi seçenekleri artmakla birlikte halen sağ kalım süresi sınırlıdır. Gelişiminde nevus hücrelerini içeren melanostik tümörlerin bir türü olan melanostik nevusların etkili olduğu gösterilmiştir. İyi huylu nevusların mutasyona uğramaları melanosit proliferasyonuna yol açmaktadır. Kötü huylu melanomun oluşumunda birçok mutasyondan bahsedilmekle beraber mutasyonların %70'i MAPK sinyal yolağını içermektedir (40). Kötü huylu melanomun metastatik potansiyelinden dolayı erken tanı ile hastalığın önüne geçilmesi gerekmektedir.

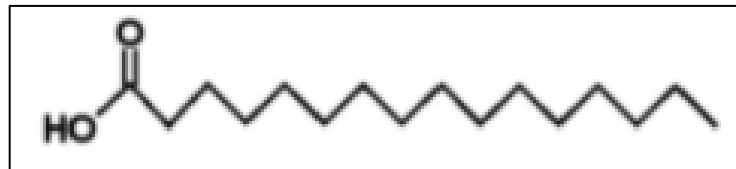
Birçok tümör tipinin insidansının azaldığı bir dönemde, melanom insidansı artmaya devam etmektedir. Çoğu hastada, primer tümörün cerrahi eksizyonu ile tedavi edilmesine rağmen, metastaz gelişebilmektedir (41). Bu sebepten dolayı cerrahi eksizyon tek başına yeterli değildir. Kemoterapi, metastazik melanom için kullanılan tedavi seçeneklerinden biridir. Ancak kemoterapötik ilaçların toksisitesinin yüksek olması melanom tedavisinde alternatif tedavilere yönelimi güçlendirmiştir. Hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapi gibi tedavi seçenekleri gözden geçirilmeye başlanmıştır (40). Melanom vakalarının yaklaşık %10'u ileri bir aşamada teşhis edildiği için rezeke edilemez veya zaten metastatiktir. Evre IV tümörlerin yaklaşık üçte birinin şiddetli prognoz ve tedaviye sürekli yanıt verme olasılığı daha düşüktür. İleri evre hastalar için çeşitli terapötik ajanların kullanımı önem arz etmiştir. Melanom hücreleri, tümör mikro çevresi ve bağışıklık sistemi ile derinlemesine etkileşime girer. Genetik etmenlerin de göz önünde bulundurulması tedavi gelişimi için oldukça önemlidir. Melanom gelişiminde ana sinyal yollarından biri olan MAPK yolağının aşırı aktive olduğu, tedavi seçeneği olarak da bir MAPKK olan ve MAPK (ERK)'i aktive eden MEK inhibitörlerinin kullandığı bildirilmiştir (5, 42).

2.7. Yağ Asitleri

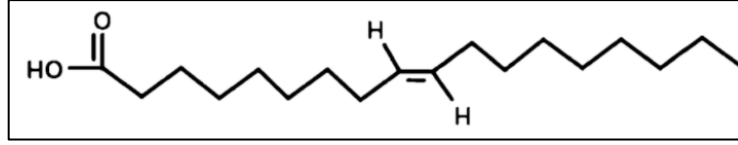
Lipidler yapılarında alkol türevi olan gliserol dışında yağ asitlerine (Fatty acid, FA) sahiptir. Yağ asitleri hücrel olarak birçok görev üstlenmektedir. Nötral lipidlerin (trigliseritler) bir parçası olarak yağ asitleri, hücrelerde enerji depo maddeleri işlevi görür. Hücre zarlarının “yapı taşları” olan fosfolipidlerin bileşenleri olarak yapısal işlevlere sahiptirler. Yağ asidi türevleri hücre içi sinyal iletiminde rol oynar. Alifatik karboksilik asitler olan yağ asitleri; canlı sistemlerde taşıyıcı misellerde, hücrelerin ve organellerin membran yapısında, hücre sinyalizasyonunda, gen ekspresyon ve regülasyonunda birçok görev üstlenmektedir(10, 11).

Yağ asitlerini gruplandırırken; C sayısına, C atomundaki çift bağların sayısı ve konumuna, insan vücudunda sentezlenme durumuna dikkat edilir. Karbon sayısı 6'nın altında ise kısa zincirli, 6 ile 10 arasında ise orta zincirli, 10'un üzerinde ise uzun zincirli olarak gruplandırılır. Yağ asitleri doymuş (Saturated fatty acids, SFA) tek bağlı yağ asitleri ve doymamış (unsature) çift bağlı yağ asitleri olarak ikiye ayrılır. Çift bağ içermeyen serbest yağ asitleri (Free Fatty Acid, FFA) “doymuş, sature” (örneğin palmitik asit 16:0, stearik asit 18:0, araşidik asit 20:0), çift bağ içeren yağ asitleri “doymamış, unsature” (örneğin palmitoleik asit 16:1, oleik asit 18:1, gadoleik asit 20:1) olarak isimlendirilir. Ayrıca, insan vücudunda sentezlenme durumuna göre esansiyel ve esansiyel olmayan yağ asitleri olarak da sınıflandırılırlar.

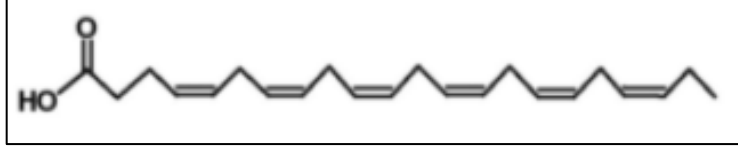
Doymamış yağ asitlerinde ise zincirde bir çift bağ bulunduğu tekli doymamış yağ asidi (monounsature yağ asidi, MUFA), birden fazla çift bağ bulunduğu çoklu doymamış yağ asidi (poliansatüre yağ asidi, PUFA) olarak adlandırılırlar. Bazı MUFA ve PUFA örneklerinin çift bağın pozisyon ve geometrisini cis ya da trans olarak ön ek yapısı kazanırlar. Yağ asitleri genellikle vücutta cis izomeri şeklinde bulunur (43). SFA, MUFA ve PUFA çizgi formülleri şekil 2.1, şekil 2.2, ve şekil 2.3'de gösterilmiştir (44, 45).



Şekil 2.1 Doymuş yağ asidi (Saturated fatty acids, SFA)



Şekil 2.2 Tekli doymamış yağ asidi (MUFA)



Şekil 2.3 Çoklu doymamış yağ asidi (PUFA)

2.7.1. Hücre zarındaki yağ asitlerinin rolü

Hücre zarının görevi hücre içi ve dış ortam arasında bir bariyer oluşturmaktır. Bu bariyer sayesinde moleküllerin kontrollü geçişi denetlenir. Hücre zarının hücrede çoğalma, farklılaşma, göç, salgılama ve iletişimin düzenlenmesinde önemli bir rolü vardır. Hücreyi dış etkilerden korumanın yanı sıra çekirdeği ve çeşitli organel türlerini çevrelemektedir. Ancak, bazı organellerdeki zar yapısı farklılaşmıştır (46, 47). Örneğin endoplazmik retikulumu oluşturan hücre altı ölçekte zarlar bulunur. Çok sayıda farklı yapıları bulunan lipidlerin, bulunduğu yere göre dağılımları da farklıdır (48). Bu durum zar lipid bileşiminin çeşitliliğine katkıda bulunur. Lipid bileşimi, zarın biyofiziksel özelliklerini de belirler. Örneğin gliserofosfolipidlerdeki yağ asitleri zar sertliğini azaltır. Böylelikle zarın deformasyonunu kolaylaştırır (44).

Lipid bileşimi aynı zamanda zar proteinleri olan iyon kanallarının da işlevlerini etkiler. Ancak bu aktiviteyi nasıl etkilediği ve mekanizması hala çözümlenememiştir (46). Zar yapısında bulunan fosfolipidler, fosfosfingolipid, sfingolipidler ve gangliositler gibi membran lipidlerinin bir parçası olan yağ asitleri zarın biyofiziksel özelliklerini etkilemektedirler. Bu lipidler, zarda bulunan kolesterol ile sıvı mozaik oluşturarak çift katmanlı yapısına katılır ve akışkanlığın modülasyonunda diğer lipidler ile birlikte görev alır. (49). Ayrıca, yağ asitlerinin zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi, çift bağın konumu ve hidroksilasyonu zarın biyofiziksel etkilerini belirler. Yağ asitlerinin doymamışlık derecesinin artmasıyla zarın akışkanlığı daha da artar. Dolayısıyla, MUFA ve PUFA doymuş yağ asitlerine göre zarda daha akışkan bir zar yapısı oluşturur (50). Diğer taraftan cis konfigürasyonu da zar akışkanlığını artırır. Kolesterol her iki durumda da modülatördür ve zar akışkanlığı değiştirebilir.

SFA, MUFA ve PUFA membran akışkanlığı ve geçirgenliği yanı sıra, hücre içi sinyalizasyon mekanizmaları yağ asitlerinin belirli miktarları ile güçlü bir denge

içindedir (51). PUFA'lar membranda vezikül oluşumu, membran geçirgenliği ve elastikiyeti gibi fiziksel özelliklerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Membran akışkanlığının yanında flip-flop mekanizmalarında da görev almaktadır (52, 53). PUFA'lar, hücre içi sinyal yollarında ve membran lipidlerin sinyalizasyonunda önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda hücre proliferasyonu, göçü, istilası ve metastazının inhibisyonu yoluyla tümör ilerlemesini baskılayabilmektedir (54).

Lipid metabolizmasındaki değişikliklerin karsinogenezin erken aşamalarında aktif bir rol aldığı iyi bilinmektedir. Cilt kanseri hücre hattına UVA ışınlarının verilmesiyle membran lipidlerinin bileşiminde değişiklik gösterilmiş ve MUFA (18:0) yağ asitlerinin de arttığı tespit edilmiştir (55). Son çalışmalarda MUFA'ların anti-enflamatuvar etkileri olabileceği üzerine kanıtlar artmaktadır. Tekli doymamış yağ asitlerinin anti-enflamatuvar etkileri olduğu savunulmuştur (56, 57).

2.8. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

ROS'lar; iyon, molekül veya radikallerden oluşabilir. En dış orbitalinde eşleşmemiş elektron bulundurmaları sebebiyle oldukça yüksek enerjiye sahiptir, reaksiyona girme eğilimindedirler ve kısa ömürlüdürler (58). ROS'lar serbest oksijen radikalleri ve non-radikal olmak üzere iki gruba ayrılır. Serbest oksijen radikallerine süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\bullet OH$), peroksil radikaller ($ROO\bullet$), nitrik oksit ($NO\bullet$), alkoksil radikaller ($RO\bullet$), tiyil radikalleri ($RS\bullet$), sülfonil radikalleri ($ROS\bullet$), tiyil peroksil radikalleri ($RSOO\bullet$) örnek gösterilir (59). En dışta eşleşmemiş elektron bulundurmaları dışında non-radikal grupta oldukça reaktif olmaları ve serbest radikal oluşumuna katılan hidrojen peroksit (H_2O_2) bu gruba dahil edilir. H_2O_2 radikal oluşumunu sağladığı için prooksidan olarak da adlandırılır (60, 61).

2.8.1. ROS kaynakları

Serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklı olabilir. Endojen kaynaklardan en çok bilineni solunum sırasında ortaya çıkan ara ürünlerdir. ROS, mitokondrinin iç zarında, solunum sonucu oksijenin indirgenmesiyle oluşur. Endojen serbest oksijen radikali kaynağı, mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntı sonucu oluşur. Bunun yanı sıra, enfeksiyon durumunda sitokinlerin salınımı başlar. Sitokinlerin salınımı nötrofil ve makrofajları uyarır ve bu hücreler serbest radikal oluşturur. İmmün sistemin bir parçası da zararlı mikroorganizmalara karşı yanıt olarak ROS üretebilmektedir (62). Vücuttaki stres kaynakları toksik maddeler, zihinsel ve bedensel yorgunluktan

kaynaklanan ROS birikimi olabilir (63). Ayrıca, metabolik aktivitelerin sonucunda da ROS üretimi gerçekleşir. Sitokrom p-450, ksantin oksidaz ve lipid peroksidasyon ROS kaynakları oluşturur. Eksojen kaynak olarak UV, gamma, X-Ray ışınları, hava kirletici gazlar, toksik kimyasallar gösterilebilir. Bunlar serbest radikal oluşumuna katkı sağlamaktadır (64). Diğer taraftan, kanser hücresi içerisinde birçok metabolik faaliyet değişmektedir. Reseptör sinyal iletimi, enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonu da ROS oluşturabilmektedir.

2.8.2. ROS ve kanser ilişkisi

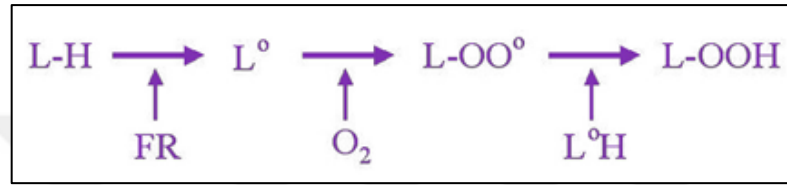
ROS, reaktif olmasından dolayı kolay şekilde reaksiyona girer ve bu da hücrelerdeki reaksiyon dinamikleri ciddi bir şekilde etkiler. Birçok mekanizmada olduğu gibi hücredeki homeostazın korunması içinde ROS'un belli bir dengede ve kontrol edilebilir olması gereklidir (65, 66). ROS'un hem yararlı hem zararlı ikili yönü mevcuttur. Belli miktarlarda ROS enfeksiyona karşı korumaktadır ve sinyal iletiminde katkı sağlar (67). ROS'un hücre içinde fazla üretilmesi sonucunda 'oksidatif stres' oluşur ve bu da DNA'da hasarlara, mutasyonlara ve gen ekspresyonuna zararlı etkilere neden olabilir (58). Kanser prognozunda ROS'un önemi büyük olup etkilediği moleküler mekanizmalar üzerine günümüzde halen çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (68).

2.9. Lipid Peroksidasyonu

Tüm biyolojik sistemler oksidatif dengeyi korumaya çalışır. Redoks dengesi hücreden başlayıp organizma boyutuna kadar biyolojik homeostazda çok önemli bir role sahiptir. Bu denge yaşam için uygun koşulları sağlar ve homeostazın korunması için oldukça gereklidir. Oksitleyici moleküllerin birikmesinden dolayı redoks homeostazında bozulmalar meydana gelmektedir. Biriken oksitleyiciler lipidleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyebilir. Bunun sonucunda bu moleküllerin aktivitelerini ve yapılarını değiştirebilmektedir. Redoks dengesinin bozulması sonucu oluşan lipid peroksitler kanser, nörodejeneratif hastalık, iltihaplanma ve böbrek dejenerasyonu dahil olmak üzere birçok hastalığa sebep olmaktadır (69).

Lipidlerin reaktif olan hidroksil radikali (HO•) ile yükseltgenmesi sonucu yapıları bozularak bir seri zincir reaksiyon başlar. Membran, doymamış yağ asitler olan fosfolipidler bakımından zengindir. Fosfolipidler hidroksil radikali ile reaksiyona girerek yapısı bozulur. Bu bozulma sonucu zincir reaksiyonu lipid peroksidasyonunu başlatmış olur (70).

Hidroksil radikali fosfolipidlerdeki çift bağ sayısı fazla olan metilen grubundan hidrojen atomu kopartır. Çift bağ sayısı fazla olandan hidrojen atomunu koparmak daha kolay olduğu için PUFA'lar peroksidasyona daha duyarlıdır. Hidrojen atomunun koparılmasıyla lipid radikali oluşur ve dayanıksız olduğu için oksijen molekülü ile tepkimeye girerek lipid peroksit radikalini oluşturur. Lipid peroksit radikali de başka bir PUFA ile reaksiyona girerek lipid peroksit ve lipid radikali oluşturur. Sonuçta lipid peroksidasyonu, ortamdaki radikaller tükenene kadar devam eder (71). Lipid peroksidasyonun zincir reaksiyonunu tanımlayan şematik gösterimi şekil 2.4'de verilmiştir (72).



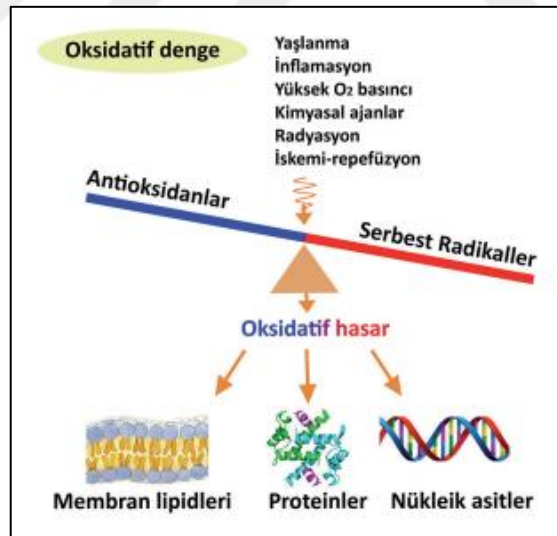
Şekil 2.4 Lipid peroksidasyon şematik gösterimi

Hücre zarının akıcılığında lipidlerin çok büyük önemi vardır. Bu akıcılık elektriksel işlevlerin faaliyeti için gereklidir. Lipid peroksidasyonu sonucu membran lipidleri ve sonrasında protein ve DNA'da ciddi değişikliklere yol açmaktadır. Membran lipidlerin oksidasyonu sonucu bu akıcılık bozulur. Membran akışkanlığının yanında membran potansiyeli de bozulur. Böylelikle geçirgenlik etkilenir. Hücre içi ve dışı iyon dengesi değişir. Bu değişim ile kalsiyum birikimleri görülür. Organeller ve hücre bütünlüğü bozularak hücre ölümüne kadar gider (69, 73).

Lipid peroksidasyonu sonucu yan ürün olarak malondialdehit (MDA) ortaya çıkar ve oldukça reaktiftir. MDA, proteinler ve DNA üzerindeki birincil aminler ile reaksiyona girerek çapraz bağlar oluşturur. Membrandaki proteinler ve fosfolipidler arasında da bu çapraz bağlanmalar oluşmaktadır. Dolayısıyla membran; sinyal iletimi, transport, geçirgenlik, akışkanlık ve dış etkilere karşı koruma görevlerini doğru bir şekilde yerine getiremeyebilir (74). Ayrıca, oksidasyon sonucu artan membran geçirgenliği, iyon gradiyentini bozarak metabolik süreçleri değiştirebilir. Mason ve ark. (75) membran kalınlığında azalma ve terminal metil gruplarının iç içe geçtiğini göstermiştir. Wong-Ekkabut ve ark. (76) da oksitlenmiş lipidlerin varlığına bağlı olarak zar geçirgenliğindeki artış olduğunu belirtmişlerdir.

2.9.1. Kanser ile lipid peroksidasyon ilişkisi

Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonudur ve bunun sonucu birçok ROS türü ortaya çıkar. Bu ROS birikimi daha önce de belirttiğimiz gibi DNA, protein, lipid ve membran yapısında hasarlara yol açmaktadır. Oluşan ürünler kanser oluşumunu tetiklemektedir. ROS lipid peroksidasyonunu, lipid peroksidasyonu da başka ROS ürünleri ortaya çıkaran kendini geri besleme yoluyla bir dizi zincir reaksiyon ortaya çıkmaktadır. Oksidasyon ürünlerinden biri PUFA'lara saldırdığında membranın yapısal ve fonksiyonel hasarına yol açmaktadır (77). Orta seviyelerdeki ROS'un nitrik oksit (NO•) gibi sinyal iletiminde rol aldığı belirtilse de aşırı seviyelerde hücre bütünlüğünü ve birçok sinyal mekanizmasının yer aldığı organellere zarar vererek onkojenik rol alabilmektedir (78). Birçok kanser türünde, lipid peroksidasyonu ROS üretimi ile ilişkilidir. Lipid peroksidasyon ürünü olan plazma MDA düzeylerinin akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanseri hastalarında sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (79-82). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi melanomada da hücre hasarının ve kanserin bir ölçütü olarak lipid peroksidasyonun ölçülmesi yapılan çalışmalarda devam etmektedir (83, 84). Oksidatif denge şekil 2.5'de özetlenmiş şekilde yer verilmiştir (85).



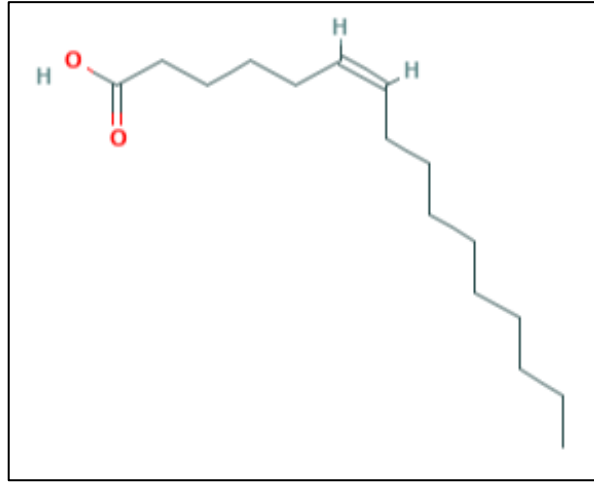
Şekil 2.5 Oksidatif Denge (85).

2.10. Sapienik Asit

2.10.1. Sapienik asidin biyolojik önemi

Cilt, doğal olarak cildi dış etkilerden koruyan yağ asidi açısından zengin sebun salgılar. Sebun içeriğindeki yağ asitlerinin etkisiyle cilt pH'ını 5.5 seviyesinde tutmaktadır. Memeliler arasında insan sebunu, en yüksek miktarda serbest yağ asidi içerir, bunlardan 16 karbonlu sapienik asit en bol bulunan tekli doymamış yağ asididir. Yağların işlevsel çok yönlülüğü, çok çeşitli sebasöz lipid sınıfları ve alifatik parçalarla birlikte, memelilere ve mikroplarla etkileşim dahil olmak üzere çeşitli ortamlarına adaptasyonu kolaylaştıran bir substrat sağlar. SA cildin kendi kendine sterilizasyonunda ve atopik dermatit iyileşmesinde rol oynayan insan sebun lipidlerinin önemli bir bileşenidir (86). Olgun yağ bezlerinden üretilen sebun bileşimi karmaşık bir lipid karışımıdır. Sebun bileşimi türler arasında farklıdır. İnsanlarda sebunun işlevleri arasında antimikrobiyal aktivite, yağda çözünen antioksidanların cilt yüzeyine verilmesi, ışıktan koruma ve spesifik lipidlerin uyguladığı pro- ve anti-enflamatuvar aktivite sayılabilir (87). İnsan sebununun bileşimini ve salgılanma oranını düzenleyen metabolik yollar tam olarak anlaşılamamıştır. İnsan sebununda trigliserit ve yağ asitleri %57,5 oranındadır (88).

Yağlar; çok çeşitli sebasöz lipid sınıfları ve alifatik parçalarıyla birlikte çeşitli ortamlara adaptasyonu kolaylaştıran substratlardır. Sebasöz lipidlerinden olan Sapienik asit (SA, 16:1 Δ 10), karboksil terminalinden itibaren 6. ve 7. karbonları arasında son derece nadir bir çift bağ konumuna sahip, 16 karbonlu tekli doymamış bir yağ asididir. Bu omega-10 mono doymamış yağ asidi ayrıca, cis-6-heksadekenoik asit (6-HA) veya 6Z-heksadekenoik asit 1 olarak da isimlendirilmektedir. Buna karşılık, anti-enflamatuvar özelliği olan ve omega-7 mono doymamış yağ asidi olan palmitoleik asit (POA, 16:1 Δ 9), cis çift bağ ile SA'nın konumsal bir izomeridir (89). SA'nın çizgi yapı formülü şekil 2.6'da gösterilmiştir (90).



Şekil 2.6 Sapienik asidin çizgi formülü

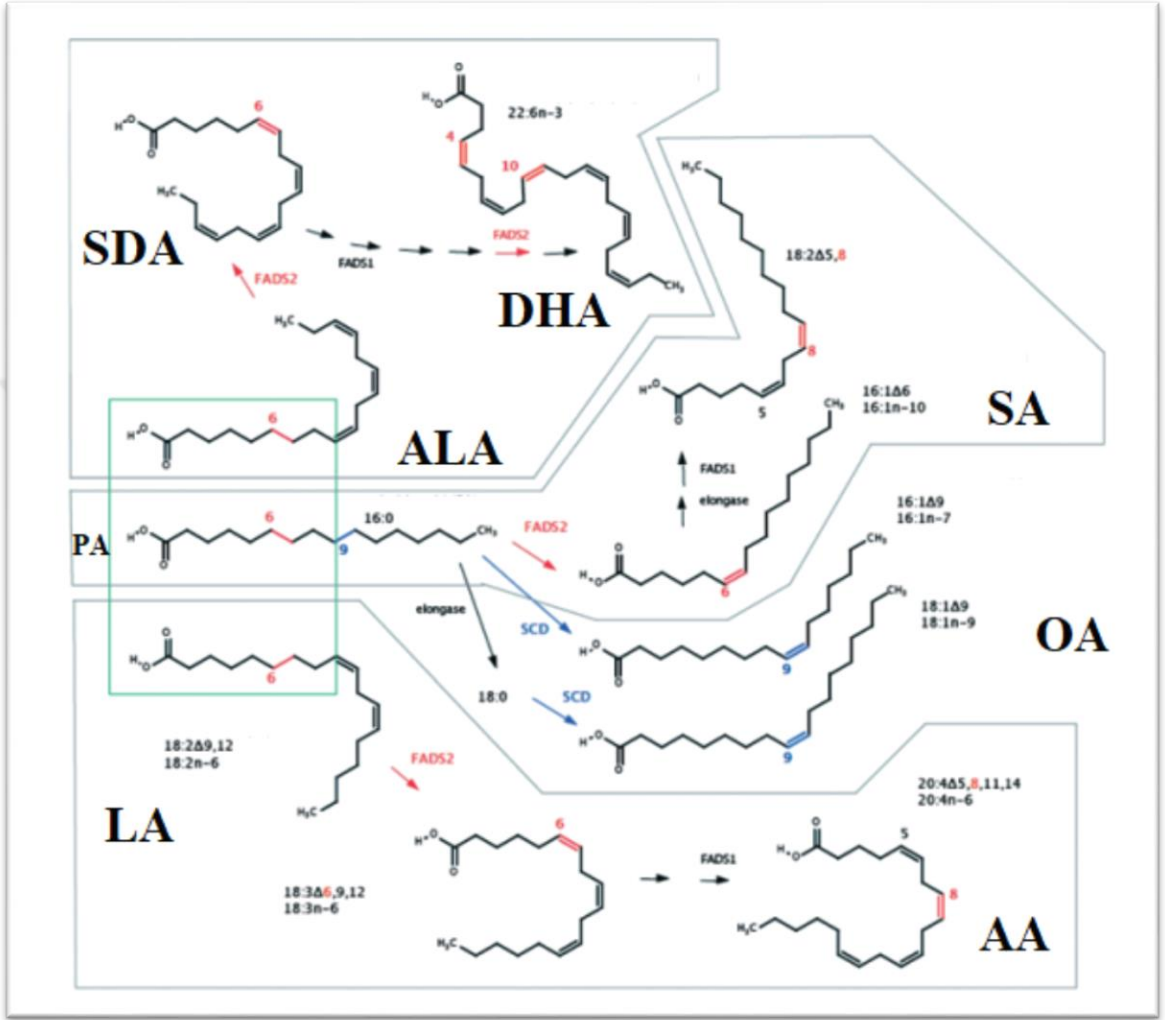
SA, cildin kendi kendine sterilizasyonunda ve atopik dermatit iyileşmesinde rol oynayan insan sebace lipidlerinin önemli bir bileşenidir. Antibakteriyel, antipsoriatik ve metabolit olarak rol oynar. Memeliler arasında insan sebumu, en yüksek miktarda serbest yağ asidi içerir, bunlardan SA en bol bulunan tekli doymamış yağ asididir (86, 91).

2.10.2. Sapienik asit biyosentezi

SA'ın, yalnızca iki yerde doğal olarak oluştuğu tanımlanmıştır: Kara gözlü susan asmasının (*Thunbergia alata*) tohum yağı ve hayvanlar aleminde doğal olarak üretilen tek yer insan sebumudur. Yağ asidi desatüraz 2 (FADS2), doku tipine bağlı olarak iki farklı tipte desatürasyon reaksiyonunu katalize eder. Yağ asit zincirinin tanımlanmış karbonları arasına yağ desatüraz enzimleri çift bağ ekler ve yağ asitlerinin desatürasyonunu sağlar. FADS2 insan yağ bezlerinin ana desatürazı olarak keşfedilmiştir. FADS2'yi aşırı ifade eden hücreler SA üretimi gerçekleştirir. Böylece PUFA tipi reaksiyonu gerçekleştiren FADS2 enziminin aynı zamanda sebasöz tip reaksiyonu da gerçekleştirdiği gösterilmiştir (92). 6-desatüraz aktivitesi, SA'yı oluşturmak üzere Palmitik Asit'i (PA) (16: 0) doğrudan desature ederek tekli doymamış yağ asidi olan sapienik aside çevirir (93).

FADS2 ve Stearoil-CoA desatüraz (SCD) membran homeostazı, enerji ve PUFA'ların biyosentezi için sürekli ifade edilen iki desatüraz enzimleridir. FADS2 enzimi substrat olarak PUFA'ları tercih etmektedir. Bu enzim iki veya daha fazla cis çift bağa sahip yağ asidini tanıyacak şekilde gelişmiştir. SA'nın sentezinde SFA olan palmitik asidin desatürasyonu için FADS2 ile reaksiyon vermektedir. Ancak ortamdaki PUFA'lar ile SFA'lar arasında bir rekabet halindedir. Bu sebeple FADS2'nin SA'yı üretmek için denge reaksiyonun %50'sini bu yöne kaydırır. 3 çeşit FADS2 tip reaksiyon gösterilmiştir;

n-3 serisi PUFA tip reaksiyon, n-6 serisi PUFA tip reaksiyon ve yağ tipi reaksiyon (86). SA'nın ve ciltteki diğer yağ asitler olan sebaleik asit, oleik asit, eikozopentaenoik asit (EPA), dokozahekzaenoik asit (DHA) ve araşidonik asit oluşum reaksiyonları şekil 2.7'de yer verilmiştir (86).



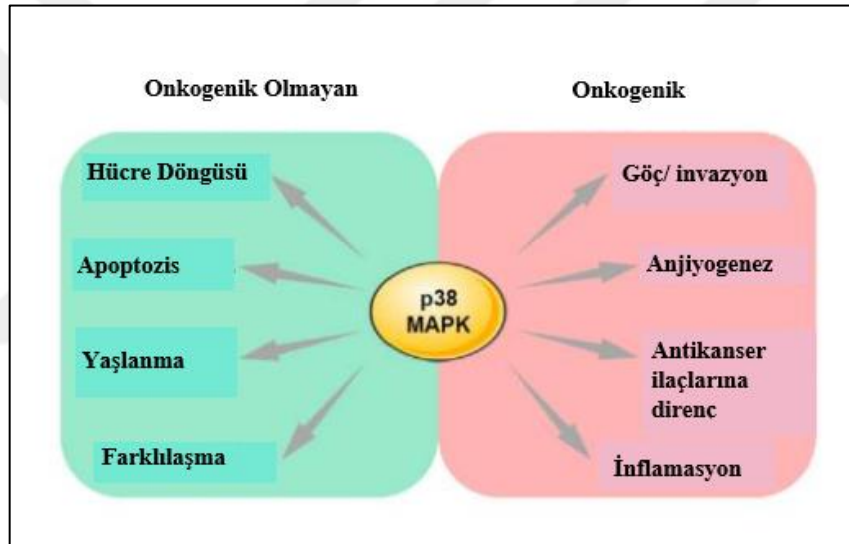
Şekil 2.7 Sapienik asit ve diğer lipidlerin biyosentezi

PA'nın FADS2 ile SA'ya dönüşümünü katalizleyen reaksiyon yağ tipi reaksiyonudur. Palmitik asit doymuş yağ asidi olmasından dolayı FADS2'nin afinitesi oldukça düşüktür. PUFA sentezinin membran homeostazı için önemi ve gerekliliğinden ötürü yağ tipi reaksiyonun gerçekleşebilmesi için bazı koşullar sağlanmalıdır. Bunlardan birincisi PA'nın FADS2'ye bağlanması için rekabet eden PUFA'ların uzaklaştırılması, ikinci olarak yüksek seviyelerde FADS2 enzim aktivitesi, üçüncü olarak PA'nın yüksek seviyelerde birikmesi ve son olarak da PA için rakip desaturazların uzaklaştırılmasıdır (94). SA üretimi için PA'ı substrat olarak kullanan diğer rakip desaturaz SCD'dir. SCD, iki doğal SFA olan palmitik asit ve stearik substrat olarak kullanır. SA'nın üretilmesi ve

SAPK'lar olarak da bilinir. JNK ve p38 sinyal yollarının hücre fizyolojisi regülasyonundaki etkileri, hücresel tip, doku ve organizmaya bağlıdır (97, 98). MAPK yollarının organizasyonu şekil 2.8'de gösterilmiştir (98).

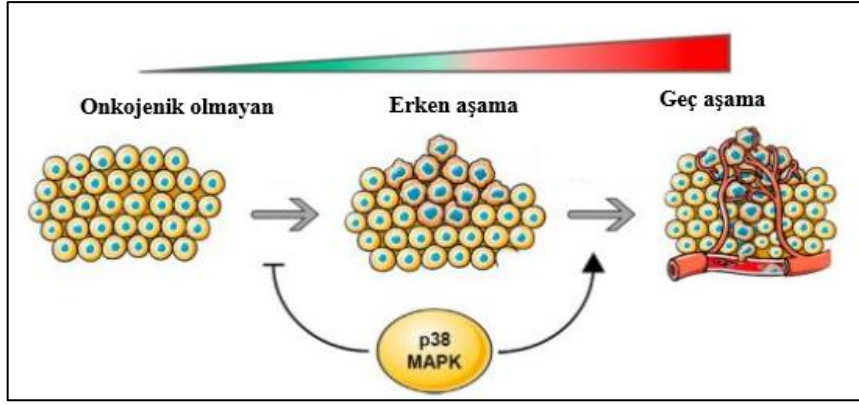
2.11.1. p38-MAPK yolağı

MAPK kaskadlarının hücre dışı sinyallerin hücresel yanıtlara dönüştürülmesinde anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir. MAPK yolları, çeşitli uyarılardan gelen sinyalleri iletir, yükseltir ve entegre eder. Ayrıca hücresel proliferasyon, farklılaşma, gelişme, enflamatuar yanıtlar ve apoptoz dahil uygun bir fizyolojik yanıt ortaya çıkarır. Memeli hücrelerinde dört tür p38-MAPK izoformu vardır: p38 α , p38 β , p38 γ ve p38 δ (99). p38-MAPK kaskadının hücresel rolünü özetleyen şematik gösterim şekil 2.9'da verilmiştir (100).



Şekil 2.9 p38'e bağlı hücresel yollar

MAPK yolları, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. MAPK p38 yolağı UV ışınlanması, ısı şoku, yüksek ozmotik stres, lipopolisakkarit, protein sentezi inhibitörleri, pro-enflamatuar sitokinler (IL-1 ve TNF- α gibi) ve belirli mitojenler dahil hücresel stres ile aktive edilir. RAS'a bağlı transformasyondaki inhibe edici rolü nedeniyle bir tümör baskılayıcı kinaz olarak tanımlanan p38, bir tümör geliştiricisi olarak da işlev görebilmektedir. Melanom tümör oluşumuna neden olan birçok onkogenik yol tanımlanmıştır, bunların çoğu RAF / MEK / ERK (MAPK) yolak aktivasyonuna bağlıdır. Bununla birlikte, p38'in kesin rolü belirsizliğini korumaktadır. Bu yüzden MAPK sinyal yolak bileşenleri, hücre dışı uyarınları geniş bir hücresel yanıtla dönüştürmede aracılık ederler. (12, 13, 101). MAPK/p38'in tümörjenezdeki ikili rolü şekil 2.9'da gösterilmiştir (100).



Şekil 2.10 p38 MAPK'nın tümörjenezdeki ikili rolü

Bir başka çalışmada, metastatik melanom hücrelerinde MAPK/p38 yolunun inhibisyonu ile hücre göçünü önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (13). Melanom tümör hücrelerini dolaşıma bırakır ancak çok küçük kısmı uzak dokulara metastaz oluşturur. Bu sebeple metastatik bir yol çizebilmesi için ekstrasvazyon basamağına ihtiyaç duymaktadır. Bu basamağı destekleyen p38/MK2 yolunun inhibisyonu ile metastatik yayılmayı azaltılabileceği yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (12). Literatürdeki başka bir çalışmada, baskın p38 sinyali, lenfanjiyojenik ve metastatik melanoma karşılık gelen bir fenotip ile sonuçlandığını ortaya koymuştur (101). Metastaz epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), sağ kalım, intravazyon, ekstrasvazyon (transendotelyal migrasyon) gibi basamakları içermektedir. Yapılan bir çalışmada, melanom hücrelerinde MAPK/p38 yolunun aktivasyonunun transendotelyal göçü üzerine etkisi araştırılmıştır. MAPK/p38'in doğrudan aktivatörü olan MKK6 ile indüklendiğinde melanom transendotelyal göçünü kolaylaştırdığı ortaya çıkmıştır (102). Literatürdeki bir başka çalışmada, p38α'nın A375 melanom hücre hattında hücre göçünü düzenlemede çok önemli bir faktör olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, p38'in kesin rolü belirsizliğini korumaktadır. p38α'nın ilk aşamalarda bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği, ancak tümör oluşumunun sonraki aşamalarında tümör aktivitesini teşvik ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle p38α, farklı kanser türlerinde farklı rollere sahip olabilmektedir (103). Çalışmada, A375 melanom hücre hattında p38α'nın susturulması ile melanom hücrelerinde hücre proliferasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir (104).

2.11.2. ERK1/2-MAPK yolağı

ERK kaskadı, çok sayıda hücre dışı uyarıcı ve çeşitli iç süreçlerle aktive edilir. Aktivasyon sonucu proliferasyon, farklılaşma, gelişme gibi süreçlerin indüksiyonunda ve ayrıca belirli koşullar altında hücre hayatta kalması, invazyon, apoptozis ve onkojenik

dönüşüm merkezinde olma gibi rolleri vardır. Sinyal kaskadı, p38 ve c-Jun N-terminal kinazlarda (JNK) olduğu gibi MAP3K modülü ile başlar. Bu modülü temsil eden molekül RAF kinazdır. RAF kinazı aktive eden bir başka molekül GTP (guanin trifosfat) bağlı RAS'dır. Bu modül bileşimi MEK1/2'yi fosforilleyerek aktive eder. Burada bahsedilen MEK1/2, MAP2K'dır. Bu molekül MAPK olan ERK'i aktive ederek sinyal ağı düzenlenir (105).

2.11.2.1. ERK1/2 ile kanser ilişkisi

ERK kaskadı, hücre içi sinyal iletim ağlarında, büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitterler gibi hücre dışı uyarılardan gelen sinyalleri iletmek için çok önemli bir aracı olarak işlev görür. ERK aktivasyonunun hücre proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (106, 107). RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) yolu aracılığıyla sinyalizasyonun anormal aktivasyonu, birçok kanserde rol oynamaktadır. Bununla birlikte Ras / Raf / ERK yolu, Ras veya B-Raf onkojenlerinde sıklıkla aktive edici mutasyonlar gösterdiği gibi, tümörlerde tanımlanan en yaygın düzensiz yollardan biridir. Bu durum MAPK/ERK yolunu terapötik hedef haline getirir.

İki izoform olan ERK1 ve ERK2 sırasıyla p44 ve p42 MAPK olarak da bilinmektedir. Normal koşullar altında ERK sinyali, hücre büyümesini ve homeostazı düzenlemek için gerekli olan geri besleme döngüleri tarafından düzenlenir. Anormal koşullarda ise başta melanom, uveal melanom ve pankreas, küçük hücreli olmayan akciğer, kolorektal, bazal benzeri meme ve karaciğer kanseri olmak üzere diğer tüm kanser türlerinin yaklaşık üçte birinde ERK düzensizdir. ERK' in iki yönlü etkileri olduğu bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. ERK' in iyonlaştırıcı radyasyon veya diğer bileşiklerle aktivasyonunun hücre ölümüne yol açabileceği belirtilirken, diğer taraftan aktif ERK' in kanser hücrelerinde büyümeyi durdurma rolüne sahip olabileceği ortaya konulmuştur. ERK kaskadının aktivasyonu apoptozis ve otofaji ile ilişkilendirilmiştir. Ras / Raf / ERK yolağının anormal aktivasyonu hücrelerin onkojenik dönüşümünü teşvik etmesine rağmen, aynı zamanda birincil hücrelerin yaşlanması ile sıkı bir şekilde ilişkilidir (108).

Birçok kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada, ERK/p38 oranına bakılarak hücre döngüsü ve tümör büyümesindeki artış ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda fosfo-ERK ve ERK protein miktarlarının proliferatif etkisi araştırılmıştır. MAPK yolağının bir üyesi olan p38'in artan ERK seviyesi ile negatif geri besleme yoluyla ERK inhibisyonu ile proliferasyonu baskıladığı belirtilmiştir. Kanser hücre hatlarında yüksek ERK/p38 oranı hücrelerin proliferatif bir yol izlediği gösterilirken

yüksek p38/ERK oranı ise tümör büyümesinin durmasına yani uyku haline geçmesine teşvik eder. Ancak bu çalışmada bahsedilen negatif geri beslemenin metastatik melanom hücre hattında (M24met) görülmediği her iki MAPK yolağındaki ERK ve p38 proteinlerinin kontrole oranla yüksek oranlarda çıktığı belirtilmiştir. Çalışmadaki melanom hücre hattında p38' den ERK'e olumsuz geri bildirimden sorumlu mekanizma net olarak bilinmemektedir (109).

MAPK/ERK sinyal yolu diğer iki MAPK sinyal kaskadından farklı olarak oksidatif, genotoksik ve ozmotik stres gibi hücresel stres koşulları ile aktive edilmektedir. Melanom gelişiminde en sık görülen mutasyonların ERK yolağını aktive edici mutasyonlar olduğunu göstermektedir. MAPK/ERK sinyali tipik olarak bir büyüme faktörü/sitokin reseptörü tirozin kinazın (RTK'lar) aktivasyonu ile başlamaktadır. Ligand bağlanması üzerine dimerizasyondan sonra ve otoposforile olarak bir dizi olay ile yolak aktive edilir. Bu kaskadın içerisinde melanomda %80'i mutasyona uğramış olan B-raf serin treonin kinaz bulunmaktadır (40). Bu sinyal transdüksiyonu ERK'i katalize etmektedir (110). Melanom türlerinin çoğunda bu mutasyon görüldüğünden dolayı ERK yolağı melanom için incelenmeye değer bir parametredir.

Melanomda artan ERK aktivitesi hızlı hücre büyümesi, artan hücre sağkalımı ve apoptoza direnç ile ilişkilidir. ERK' in aktivitesi, hem ekstrasellüler matriksi (ECM) parçalayan enzimlerin hem de metastazı teşvik eden integrinlerin artan ekspresyonu ve E-kaderinin aşağı regülasyonu yoluyla melanomun metastatik davranışını açıklamaktadır (111).

Melanomun metastatik yayılımı, morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir. Melanom hücrelerinin MEK inhibitörleri ile tedavisi sonucunda A375 hücrelerinin hücre kültüründe kullanılan ECM'yi andıran matrijeldeki istilasını azaltır (111). ERK, MEK-1 ve MEK-2 kinazların bilinen tek substratıdır ve ~%80 yapısal homoloji paylaşır. Bu nedenle MEK-1/2, MAPK sinyalleşme kaskadında popüler terapötik hedefler olmaya devam etmektedir. MEK inhibitörlerinin, melanomda tümör gelişimini inhibe ettiği ve MEK aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (112).

ERK1/2' nin aktivasyonu genellikle hücrenin hayatta kalmasını destekler; ancak belirli koşullar altında ERK1/2'nin proapoptotik işlevlere sahip olabileceği gösterilmiştir. ERK aktivasyonunun, osteosarkom ve nöroblastom hücre hatlarında sisplatin kaynaklı hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (113). Biz de çalışmamızda, sapienik asidin ERK aktivasyonunu değiştirebileceğini düşünmekteyiz.

2.11.3. JNK-MAPK yolağı

c-Jun N-terminal kinazlar (JNK), transkripsiyon faktörü c-Jun'u amino terminalinden fosforile eden protein kinazlardır. Stresle indüklendiği için, stresle aktive olan protein kinaz (SAPK) yolu olarak da adlandırılır. Bu protein kinazın 10 izoformu vardır ve 3 farklı gen olan JNK1, JNK2 ve JNK3'ten türetilir. JNK kaskadı, apoptozis, inflamasyon, sitokin üretimi ve metabolizmada önemli roller üstlenir. JNK' yı stres dışında DNA hasarı, UV ışımaya, ozmotik şok, ROS, sitotoksik ilaçlar da aktive etmektedir. MAP2K protein kinazları MKK4/7 proteinleridir. Spesifik hücre tiplerinin çoğalmasını, farklılaşmasını, hayatta kalmasını ve göçünü kontrol eder. Sinyalin yoğunluğuna, süresine ve diğer sinyal yolları arasındaki çapraz etkileşimine bağlı olarak antagonistik etkiler uygulayabilmektedir (114).

2.11.3.1. JNK yolunun aşığı regülasyonu

İnflamatuar sitokinler, UV ışımaya ile DNA hasarı sonucu JNK kaskadı hücreye ölüm emrini veren bir seri sinyal başlatır. Böylelikle hücreyi mutasyondan korumak için apoptoza götürür. Apoptozu teşvik etmek için ölüm sinyalleri veren transkripsiyon faktörlerini uyarır. Bunun dışında STAT (sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü) ve CREB (cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein) gibi transkripsiyon faktörleri, hücre hayatta kalma mekanizmasının inhibisyonunu da gerçekleştirerek hücreyi programlanmış ölüme götürmede görev alır (115, 116).

2.11.3.2. JNK/SAPK ile kanser ilişkisi

JNK, kanser hücre hatlarında yüksek seviyelerde regülasyonu onkojenik rol oynar. JNK proteinlerinin hiperaktivasyonu, birden çok kanser hücre hattında ve doku örneklerinde bildirilmiştir. Örneğin hepatoselüler karsinomlarda JNK1'in aşırı aktivasyonunun hem hastalık prognozu hem de progenitör hücre biyobelirteçlerinin ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (117). Çeşitli tümörlerden türetilmiş hücre hatlarında JNK2 için bir onkojenik işlevi tanımlamıştır. Örneğin, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda, normal akciğer kontrol dokusundan üç kat daha yüksek JNK2 proteinine rastlanmıştır. Yapılan çalışmalara göre JNK2 α aktivasyonundan sonra STAT3'ün transkripsiyonel aktivitesini düzenlemektedir. Böylece onkojenik c-Myc genlerin ekspresyonunu sağladığı gösterilmiştir (118). Başka bir çalışmada, erken evre Ras ile uyarılan akciğer tümörü oluşumunda hem JNK1 hem JNK2 gerekliliği gösterilmiştir. Ancak bu bulgular, JNK'nın tümör baskılama rolünü de dışlamaz (119).

Uyaranlara ve JNK aktivasyonunun gücüne ve süresine bağlı olarak hücrel yanıt oldukça karmaşık olup apoptozun indüksiyonundan, artan hayatta kalma ve proliferasyona kadar değişen çeşitli sonuçlara sahiptir. Kansere hücrelerinde, hayatta kalma ve çoğalma gibi faaliyetleri gerçekleştiren bir “onkokinaz” olarak rol üstlenebilir iken, bir tümör baskılayıcı olarak da görev alabilir. JNK yolu her iki sürece de aracılık edebilmektedir. Bu farklılıklar aynı zamanda dokuya göre değişkenlik gösterebilmektedir (114).

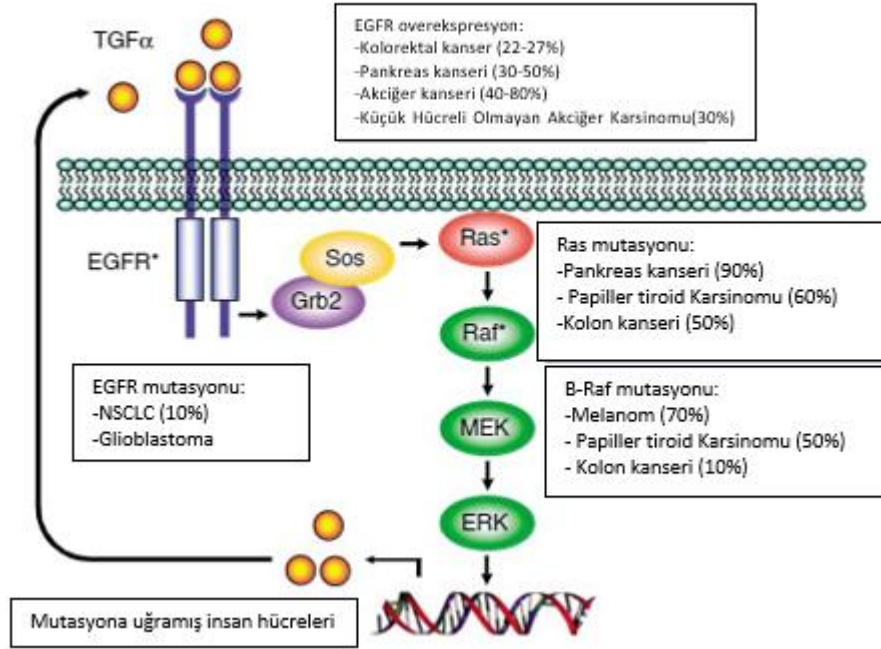
JNK bir yandan hücrenin hayatta kalması ve proliferasyonu için çalışırken, bir yandan hücreyi apoptoza götürmesiyle kanserde iki rolü olduğunu ortaya koymuştur. JNK1’in antiapoptotik genlerin ekspresyonunu bastırırken JNK2’nin tümör baskılaması ve hücre farklılaşması için apoptoz veya hücre büyümesi ile ilgili genlerin aktivitesini negatif olarak düzenler. Bu durum da JNK’nin farklı izoformlarının farklı işlevleri olduğunu göstermektedir (120).

Daha önce de bahsedildiği gibi, melanom hücrelerinde baskın JNK sinyalinin yüksek oranda proliferatif bir fenotip sergilediği gösterilmiştir (101). JNK’ların aşırı ekspresyonu ve aktivasyonu kanser hücre hatlarında gözlemlenmiştir. Çeşitli JNK izoformlarının keratinosit dönüşümünü desteklediği rapor edilmiştir. Melanomların invazivliği ve uzun süreli proliferasyonu için JNK1’den daha çok JNK2’nin gerekli olduğu ifade edilmiştir (121). Cilt kanserinde, JNK hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı özellikleriyle kanser gelişiminde paradoksal roller oynar. JNK2 fosforilasyonu, skuamöz hücreli karsinom hücre dizileri ve dokularında, normal keratinositlere ve sağlıklı deri örneklerine kıyasla artmıştır. JNK2’ nin aksine, JNK1’in tümör baskılayıcı işlevi gösterilmiştir. Son olarak, skuamöz hücreli karsinom antijeni 1’in, JNK1 inhibisyonu yoluyla keratinositleri apoptotik hücre ölümünden koruduğu belirlenmiştir (118, 119). Yapılan bir çalışmada, melanom hücrelerinde p-JNK’ nın yukarı regülasyonu sonucu melanogenez arttırdığı belirtilmiştir (122, 123).

2.12. EGFR-MAPK Kansere İlişkisi

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), birçok insan kanserinde aşırı eksprese edilir veya mutasyonel olarak aktive edilir. EGFR insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER), reseptör tirozin kinazlar (RTK’ lar) ailesinin bir üyesidir. Ekstraselüler, transmembran ve intraselüler olmak üzere 3 domaini bulunmaktadır. Ekstraselüler domaini ligand bağlanma bölgesi içerir. İntraselüler domainde ise tirozin kinaz ve aşağı yönde sinyal yolunun aktivitesi sağlanmaktadır. Ligandın

bağlanması ile reseptörde konformasyonel değişiklik olmaktadır. HER ailesi üyesi başka bir reseptör ile homo/heterodimer oluşumu sağlanır. Dimerizasyon sonucu tirozin kinaz domainlerinin aktifleşmesi ile otoposforilasyon gerçekleşir ve aşağı yönde sinyal yolu düzenlenir. Bu sinyaller ile hücre çoğalması, farklılaşması, hücre göçü, hücre büyümesi ve hayatta kalması teşvik edilerek çeşitli hücre fonksiyonları düzenlenir (124, 125). Melanoma da dahil birçok kanser türünde EGFR sinyal yolu MAPK yolları ile ilişkilendirilmiştir. MEK/ERK yolu aktivasyonu ile EGFR reseptörü olan dönüştürücü büyüme faktörü alfa'nın (TGF- α ; transforming growth factor alpha) ekspresyonu sağlanır ve EGFR'nin kalıcı olarak geri besleme yolu ile uyarılmasına neden olur (Şekil 2.10) (106).



Şekil 2. 11 EGFR-MAPK'nın tümörjenezdeki rolü (106).

2.13. Lipidlerin Reseptörler ile İlişkisi

Hücre membranında bulunan reseptörler bir lipid havuzunda hareket eden botlar gibidir ve aktivitelerini bu havuz içinde göstermektedirler. Aynı zamanda, lipidler hücre yüzey reseptörlerinin yapısına da katılmaktadır. Bu sebeple kanser gelişiminde hücre membran yağ asidi profili ve membrandaki reseptörlerin aktivitesi ve miktarı oldukça önemlidir. Hücresel işlevlerin çoğu membran lipid bileşimindeki değişikliklerden etkilenmektedir. Membran lipid içeriği ve bileşimi hücre türleri arasında değişiklik göstermektedir. Bu sebeple hücresel işlevler üzerinde tek tip bir etki göstermezler.

Zar lipid bileşimindeki değişiklik, belirli reseptörler, taşıyıcılar ve enzimlerin etkileşime girdikleri lipidlere göre duyarlılık gösterebilir. Bu duyarlılık, reseptörlerin ve taşıyıcıların bağlanma bölgelerini etkileyen konformasyonel değişiklikleri içerebilir. Enzimlerin aktif bölgesi değişiklik gösterebilir. Aynı zamanda lipid çift tabakada lipidlerin yanal hareketliliğindeki değişimler ve lipidlerin diğer zar molekülleri ile olan etkileşiminden kaynaklanan işlevsel bir değişiklik görülebilir.

Yağ asitlerinin endojen sentezi için anahtar enzim olan yağ asidi sentazın (FAS) normal doku tiplerinde (yağ ve karaciğer dokuları dışında) ekspresyonu düşüktür. Bununla birlikte, FAS birçok kanserde aşırı eksprese edilir ve tümör hücresi proliferasyonu ve apoptozla güçlü bir şekilde bağlantılıdır (126). Normal hücrelerde tercihen eksojen kaynaklardan yağ asidi almaktadır ancak, kanser hücrelerindeki yağ asitlerinin %90'ından fazlasının FAS tarafından *de novo* sentezlendiği tahmin edilmektedir. Hücre dışında bol miktarda serbest yağ asidi varlığında bile kanser hücreleri anormal yağ asidi üretimi sergiler (127).

Serbest yağ asidi reseptörleri (FFAR), enerji homeostazı ve metabolizma olmak üzere çeşitli fizyolojik eylemlerde rol oynar. FFAR türlerine göre kısa veya uzun zincirli yağ asitleri ile aktive edilebilir. FFAR'lar, ERK1/2, JNK ve p38 gibi çeşitli MAPK'lara bağlanabilir. ERK, hücre proliferasyonunun ana düzenleyicisidir, JNK ve p38-MAPK, stres sinyallerinde ve birçok enflamatuvar enflamatuvar süreçte rol oynamaktadır (128). FFA türleri olan FFA2 ve FFA3 reseptörlerinin aktivasyonu ile ERK1/2'nin fosforilasyonunu indüklemektedir. FFA2 reseptör aktivasyonu ise p38-MAPK'nın fosforilasyonunu gerçekleştirir. FFA reseptörleri aynı zamanda JNK'yi zayıf bir şekilde aktive edebilir (129).

Çalışmamızda, insan sebumunda yağ asidi olarak en bol bulunan sapienik asidin melanom hücre hattına eksojen olarak verilmesi sonucu hücre membranındaki yağ asidi profili ve reseptörlerin aktivitelerinde değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir. Bu değişikliklerin sonucu kanser yolaklarının etkilenmesi beklenmektedir. Sapienik asidin kanser yolaklarında görev alan proteinlerin, ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki değişiklikleri belirlenerek yeni kemoterapötik tedaviler hakkında ipuçları verecektir.

3. YÖNTEM

3.1. Hücre Kültür Çalışmaları

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen çalışmamız üniversitemizin Tıp Fakültesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Hücre dizisi ve ilaçlar

A375 epitelyal karakterli insan malign melanoma hücre dizisi ATCC'den temin edilmiştir. Bu hücre hattı ligandların yokluğunda MAPK yolunun yapıcı aktivasyonuna yol açan bir proto onkogen olan BRAF endojen olarak eksprese eder. Bu hücreler BRAF (V600E) mutantıdır.

3.1.1.1. Hücre kültürü ve hücrelerin deneylere hazırlanması için gerekli çözeltiler

1) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): Sigma-Aldrich'den alındı. 500 mL'lik DMEM kullanılacağı zaman 50 mL steril FBS (Fetal Sığır Serum) ve 5 mL steril penisilin-streptomisin çözeltisi eklendi. +4°C'de saklandı.

2) FBS (Fetal Sığır Serumu): Gibco'dan inaktive edilmiş olarak temin edildi. 50 mL'lik falkon tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

3) Penisilin-Streptomisin: Gibco'dan alındı. 10 mL'lik falkon tüplerde kullanılmadığı sürece -20°C'de saklandı.

4) DMSO (Dimetil Sülfoksit): Sigma'dan alındı. Oda ısısında saklandı.

5) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Magnezyumsuz ve kalsiyumsuz)(PBS): Sigma'dan hazır olarak alındı. Oda sıcaklığında saklandı.

6) Tripsin-EDTA Solüsyon: Sigma'dan hazır olarak temin edildi. +4 C'de saklandı.

7) Tripkan mavisi: Sigma'dan alındı. Oda sıcaklığında saklandı.

8) Toluidin mavisi: Sigma'dan alındı. Oda sıcaklığında saklandı.

9) Sapienik Asit: Hücrelere uygulanan sapienik asit Cayman kimyasaldan temin edildi ve %100 DMSO'da çözülerek -20°C'de saklandı. Sapienik asit dozları ana stok çözeltiden hesaplanarak hücrelerin kendi medyumları içinde inkübe edildi.

10) RIPA: Radyo İmmüno Presipitasyon Assay Lizis Tamponu 100X, -20°C

11) PIC: Protein İnhibitör Kokteyl, +4°C

3.1.2. Hücrelerin çoğaltılması

Hücreler steril %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyerinde kültüre hazırlandı. A375 hücreleri çözdürüldükten sonra %5 CO₂, %95 nem ve 37°C

sıcaklığında steril inkübatör içerisinde çoğaltıldı. Hücreler flask içerisinde %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra flask yüzeyinden kaldırabilmek için tripsin enzimi kullanıldı. İlk olarak 25 cm²'lik flask içerisindeki DMEM medyumunu steril pipet ile uzaklaştırıldı. Yüzeydeki ölü hücreleri uzaklaştırmak ve tripsinin etkisini iyi gösterebilmesi için 1- 2 mL PBS eklendi. PBS' in flask içerisinde nazik hareketler ile dikkatli şekilde yayılması sağlandı. PBS steril pipet ile uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL tripsin enzimi eklendi. Tripsin enziminin etkisini iyi gösterebilmek için 3-4 dk inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı inverted mikroskop altında incelendi. Kaldırılan hücreler taze DMEM eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı. Hücreler eşit şekilde flasklara dağıtıldı. Hücreler yoğunluklara ve ihtiyaca göre birkaç defa daha bu işlem uygulandı. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler SA ile inkübe edilmesi için eşit şekilde petri kaplarına ekim yapıldı. SA ile inkübasyondan sonra hücreleri kaldırmak için tripsin yerine kazıyıcı (scraper) ile hücreleri kaldırma işlemi yapıldı.

3.1.3. Hücrelerin dondurulması

Hücrelerin bir kısmı sonraki çalışmalar için stoklandı. Bu stoklama işlemi hücreleri dondurularak yapıldı. Dondurma işlemi için öncelikle flasktan kaldırıldı ve tripsinin aktivitesini kaybedilmesi için medyum eklendi. Hücreler steril pipet ile falkon tüpe aktarıldı ve 300xg'de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı. DMEM medyuma %5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Dondurma solüsyonu pellet üzerine eklendikten sonra pipetaj edildi. Hücre süspansiyonları 1 mL olacak şekilde cryo-tüplere konuldu ve -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.1.4. Hücrelerin çözülmesi

Daha sonra kullanılmak üzere stokladığımız dondurulan hücreleri çözülmek üzere 37°C'de sıcaklığında hızlı bir şekilde çözdürüldü. Hücre süspansiyonu çözülür çözülmez cryo tüplerin dış yüzeyi %70'lik alkolle temizlendi. Steril kabin içerisinde 15 mL falkon tüpe 9 mL DMEM eklendi. Cryo tüplerdeki 1 mL hücre süspansiyonu falkon tüpe alındı ve yavaşça pipetaj yapıldı. 300xg de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Falkon tüpde kalan hücre pelleti taze DMEM ile süspanse edildi. Hücre süspansiyonu flasklara eşit şekilde ekildi. Hücreler çoğaltılmak üzere %5 CO₂, 37°C ve %95 nemli hava ortamına sahip inkübatörde kültüre edildi.

3.2. Sapienik Asidin Sitotoksisite Çalışması

3.2.1. Hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyonun MTT kiti ile belirlenmesi

3.2.1.1. Prensiip

SA'nın A375 hücre dizilerini %50'sini öldüren konsantrasyon değerini hesaplamak için MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) testi yapıldı. Metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından sarı renkli tetrazoliumu mor renkli formazana indirger. Oluşan mor rengin yoğunluğu spektrofotometrede ölçümü yapılır. Mor rengin yoğunluğu canlı hücre ile doğru orantılıdır.

3.2.1.2. Reaktifler

Reaktif A: MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid), 50 mg/vial.

Solüsyon B: PBS, pH 7.4, 15 mL.

Solüsyon C: DMSO (Dimetil Sülfoksit) +4⁰C'de

SA'nın farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µM) 24 ve 48 saatlerde inkübasyonlar yapılarak canlılık testi yapıldı.

3.2.1.3. Deneyin yapılışı

SA'nın A375 hücre dizileri üzerindeki sitotoksitesini ölçebilmek için deney 3 gün sürdürüldü. İlk gün flasklarda çoğalmaya bıraktığımız hücreler tripsin ile kaldırıldı. Kaldırılan hücrelere taze DMEM medyum eklenerek tripsin inhibe edildi. 10 mL falkon tüpe aktarıldı ve 300xg'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet 2 mL uygun medyumla süspanse edildi. Hücre süspanسیونunda 10 µL alındı ve 10 µL tripan mavisi ile pipetaj yapıldı. Hücreler BioRad'ın TC 20 hücre sayım cihazı ile sayıldı. Her kuyuya 25000 hücre olacak şekilde 100 µL hücre süspanسیونundan konuldu. 96 kuyucuklu plakalara ekim yapıldıktan sonra hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatörde bekletildi. Hücreler yapıştıktan sonra medyum atıldı ve önceden belirlenen dozlarda kuyucuklara konuldu. 24 ve 48 saat inkübasyonları için %5 CO₂, %95 nemli hava ortamında ve 37⁰C sıcaklığındaki inkübatörde bekletildi.

İnkübasyon süresi bittikten sonra PBS ile bir kez yıkama işlemi yapıldı. Çalışılacak her kuyuya 100 µL medyum ve 20 µL reaktif A (MTT) eklendi. 2-3 saat kadar %5 CO₂, %95 nemli hava ortamında ve 37⁰C sıcaklığındaki inkübatörde inkübe edildi. Sürenin sonunda kuyucukların dibinde formazan kristalleri gözlemlendi. Kuyucukların üzerine 100 µL kadar solüsyon C eklendi ve 5 dk çalkayıcıda karışması için bırakıldı. Biotech plate okuyucusunda 570 nm'de ve 630 nm referans dalga boyunda BioTek Synergy H1 Hybrid multi-mode monokromatör floresans mikropalak okuyucu ile

absorbans ölçüldü. Kontrol grubunun absorbans değerleri SA ile inkübe edilen diğer dozların absorbans değerlerinden çıkarıldı. Böylelikle yaşayan hücre yüzdesi hesaplandı. Deneyler iki kez tekrarlandı ve her doz grubunda en az 4 örnek çalışıldı.

3.3. Sapienik Asidin A375 Hücreleri ile İnkübasyonu ve Hücrelerin Toplanması

3.3.1. Gruplandırma

Grup 1: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemek için kontrol (SA uygulanmayan), 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyonları.

Grup 2: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemek için kontrol (SA uygulanmayan), 24 ve 48 saat inkübasyonları.

3.3.2. Deneyin yapılışı

Grup 1 ve Grup 2 için inkübasyon protokolü: Flasklarda çoğaltılan A375 hücrelerini tripsin ile kaldırıp petride 3×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin yapışması için 1 gün inkübatörde bekletildi. Ertesi gün her petri için taze DMEM ile SA 10 µM çözeltisi hazırlandı. Bütün petrilereki medyumlar atıldı ve PBS ile yıkandı. Kontrol, 0, 30dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyonu için ilaçlı medyumlar eklendi. Kontrol için SA içermeyen DMEM eklendi. Kontrol, 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat ve ayrıca kontrol, 24, 48 saat inkübasyonları için %5 CO₂, %95 nemli hava ortamında ve 37⁰C sıcaklığındaki inkübatörde bekletildi. Hücreleri toplamadan önce PBS ve RIPA çözeltileri soğutuldu. İnkübasyon süresi sonunda ilaçlı medyum atıldı ve iki kez PBS ile yıkandı. PIC çözeltisi 100X'den 1X'e seyreltildi. 3000 µL RIPA' ya 300 µL PIC eklendi. RIPA' dan 500 µL petrilere konuldu ve buz üzerinde 15 dakika bekletildi. Süre bittikten sonra kazıyıcı ile hücreler petriden kaldırıldı ve RIPA süspansiyonu ile ependorf tüplere aktarıldı. Hücreler 1 dk boyunca vortekslendi ve önceden +4⁰C'ye soğutulmuş santrifüj cihazında 20000xg'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant başka bir ependorf tüpe alındı ve etiketlenmesi yapıldıktan sonra protein tayinin ve western blot deneylerinde kullanılmak üzere -20⁰C'ye kaldırıldı.

3.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

3.4.1. Prensipte

Yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanarak renk oluşturması esasına dayanır. Kırmızı-kahverengi G-250 boyası bazik aminoasitlere bağlandığında mavi renk verir. Farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde mavi rengin şiddetindeki değişimine bakılarak hassas bir ölçüm yapılmaktadır. Mavi renk

şiddeti 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik mikroplak okuyucu ile absorbans ölçülür. Bilinmeyen protein konsantrasyonunu standart grafiği ile miktar tayini yapılır.

3.4.2. Reaktifler

BSA : Sığır serum albumin, 2 mg/ml, +4⁰C

CPPA: Commassie Plus Protein Assay Kit, +4⁰C

UPS: Ultra Saf su

3.4.3. Gruplandırma

Grup 1: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatların protein tayinlerinin yapılması.

Grup 2: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 24 ve 48 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatların protein tayinlerinin yapılması.

3.4.4. Deneyin yapılışı

Standart eğri grafiği için belli aralıktaki konsantrasyonlar ile standart çalışması yapıldı. Standart çalışmasında kullanılan protein BSA' dır.

Tablo 1. Protein Standart çözeltisi hazırlama tablosu

Tüp	BSA(µL)	Su (µL)	Konsantrasyon (µg/mL)	CPPA (µL)
A	0	1000	0	1000
B	1	999	2	1000
C	2	998	4	1000
D	4	996	8	1000
E	6	994	12	1000
F	8	992	16	1000
G	10	990	20	1000
H	16	984	32	1000

- Standart çalışmasında 8 tane 2 mL'lik ependorf tüplere yukarıdaki harflendirme marker kalem ile yapıldı.
- Ultra saf su sırasıyla yukarıda verilen ölçülerde tüplere sırasıyla hazırlandı.
- BSA +4⁰C dolabından çıkarıldıktan sonra tabloda verilen ölçüde tüplere eklendi.
- CPPA boyası her tüpe 1000 µL eklendi.
- Tüplerin her birinden 200 µL alınıp 96 kuyucuklu plakalara ikili eklendi.

- Örnekler kuyucuklara eklendikten sonra BioTek Synergy H1 Hybrid multi-mode monokromatör floresans mikropalak okuyucuda 595 nm' de ölçüldü. Absorbans değerleri kaydedildi ve standart grafik oluşturularak numunelerdeki protein miktarı $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı.

3.5. Western Blot Protein Tayin Yöntemi

3.5.1. Prensip

Western Blot protein tayin yöntemi hücre lizatları içerisindeki spesifik proteinlere uygun antikorlar ile nitelik ve nicelik analizi yapılmasını sağlar. Proteinlerin konsantrasyon değişimlerini karşılaştırma ve görsel açıdan gözlemleyebilmek için değerli bir yöntemdir. Proteinler denatüre edilir ve jelde elektroforezi yapılır. Jelde proteinler elektrik alan ile kilodaltonlarına (kDa) göre ayrılır. Proteinlerin antikor ile işaretlenip görüntülenebilmesi için uygun bir membrana elektrik akımını ileten bir düzenek ile aktarılır. Membrana geçen proteinlerden spesifik proteinlerin tayini için immüno-blotlama yani antikorlarla işaretleme işlemi gerçekleştirilir. İşaretlenen spesifik proteinlerin antikorları tanıyan enzim bağlı ikincil bir antikor ile işaretlenmesi yapılır. Bu ikincil antikora bağlı enzim substratı kemilüminesans ışımaya veren ürüne dönüştürür. Işımlar görüntüleme cihazı ile görüntülenir ve kaydedilir.

3.5.2. Reaktifler

Ayrıştırma Tamponu (1,5 M Tris Base): pH: 8.8'e ayarlandı ve kullanılıncaya kadar +4°C' te saklandı.

Yükleme Tamponu (0,5 M Tris Base): pH: 6.8'e ayarlandı ve kullanılıncaya kadar +4°C' te saklandı.

%10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS): 10 gr SDS tartıldı, dH₂O ile çözüldü ve 100 mL'e tamamlandı 0.45 μm 'lik filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C'te saklandı.

%10 Amonyum persülfat (APS): Her jel dökümü için günlük taze hazırlandı. dH₂O ile çözüldü ve kullanılıncaya kadar +4°C 'de saklandı.

4X Yükleme tamponu: 900 μl Laemli Buffer, 100 μl β -merkaptoetanol hazırlandı ve kullanılıncaya kadar +4°C 'de saklandı.

Running (Yürütme) Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.1 SDS): 1000 mL dH₂O ile çözüldü.

Transfer Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.05 SDS): dH₂O ile çözüldü. Ayrı bir mezüre 250 mL metanol konuldu. Transfer işlemine kadar hem tampon hem de

metanol 4°C'de soğutuldu. Transfer işleminden hemen önce tampon ve metanol karıştırıldı.

TBS (Tris Base Solution): 1000 mL dH₂O çözdürüldü ve pH 7,6'ya ayarlandı.

Tween 20 (T): Sigma'dan hazır olarak alındı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.5.3. Gruplandırma

Grup 1: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki spesifik proteinlerin belirlenmesi.

Grup 2: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için 24 ve 48 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki spesifik proteinlerin belirlenmesi.

3.5.4. Deneyin yapılışı

3.5.4.1. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve transferi

- Western blot çalışmalarımız her aşaması Mini-PROTEAN (BioRad) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Jel dökümü için sistemin kalın ve ince camları önce saf su ile yıkandı ve %70'lik alkol ile silinerek temizlendi ve sistemin jel dökme aparatına yerleştirildi. Öncelikle Separating (Ayrıştırma) jeli %10 Akrilamid/bis-akrilamid olacak şekilde hazırlandı.
- 1,5 mm'lik camlar kullanıldı. Camlar birleştirilip sıkıştırıldıktan sonra otoklav bandı ile alt tarafı sızmasını önlemek amacıyla bantlandı ve kalın camın üst kısmından ve %10 ayrıştırma jeli 1 cm kalacak şekilde döküldü. Vakit kaybetmeden üstüne 1 mL izopropanol alkol döküldü.
- Ayrıştırma jeli tamamen polimerize olduğunda (45 dk-1 sa) izopropanol kurutma kâğıdı yardımıyla alındı ve Stacking (Yükleme) Jeli %5 Akrilamid/bis-akrilamid olacak şekilde. Ardından taraklar nazikçe yerleştirildi ve 30 dk polimerize olması beklendi.
- Daha önceden konsantrasyonlarını Bradford yöntemi ile tayin ettiğimiz örneklerden 30 µg olacak şekilde alınarak steril bir ependorfa aktarıldı. Daha sonra örnek hacminin 1/3'ü oranında 4x yükleme tamponu eklendi ve 95°C'de 5 dakika kaynatıldı. Tamamen polimerize olmuş olan SDS-PAGE jel sistemin yürütme tankına alındı ve yürütme tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler kuyulara yüklendi.

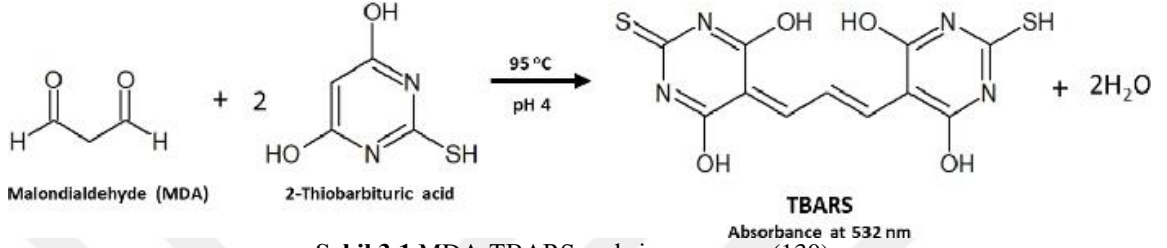
- 4 µl marker yüklendi. Örnekler yüklendikten sonra 130 V' da 90 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi ile ayrılan protein örnekleri, SDS-PAGE jelden Polyvinylidene flüoride (PVDF) membrana daha önceden hazırlanan transfer tamponu içinde 4°C'te 83 mAmp'de 17 saat süresince ıslak transfer yöntemi ile transfer edildi.
- PVDF membrana transfer olan protein örneklerimiz immünoyoblotlama için ilgili ilk olarak süt tozu ile bloklama yapıldı.
- Yıkama için TBS-T solüsyonu hazırlandı. 20X TBS'den 1X'e çevrildi. Ultra saf sudan 950 mL, 50 mL TBS ve 1 mL Tween karıştırıldı.
- 1X TBS ile %5'lik süt tozu karışımı hazırlandı. PVDF membran 1 saat bloklandı. Bloklama bittikten sonra daha önce hazırladığımız TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı.
- Primer antikorlar ile 1:1000 oranında %5 BSA ile hazırlandı. Toz BSA 1X TBS içinde çözdürüldü. PVDF membranlar antikorlar ile işaretleme yapılacak bölgelerden işaretlendi ve bu alanlar kesildi. Kesilen membranlar uygun antikorlar ile +4⁰C'de 2 saat inkübe edildi.
- Primer ile işaretleme bittikten sonra TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı. Yıkama bittikten sonra 1:20000 oranında süt tozu ile hazırladığımız HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Sekonder ile işaretlendikten sonra son kez TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı. Yıkama işlemleri sonunda ECL (Gelişmiş Kemilüminesans) solüsyonu kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatıldı ve spesifik protein bantları Syngene G:Box görüntüleme cihazı tarafından fotoğraflandı ve cihazın kendi programıyla nicelik analizi yapıldı.

3.6. Lipid Peroksidasyon Ölçümü

3.6.1. Prensip

Hücredeki ROS miktarını direkt ölçmek için kısa yarı ömürleri nedeniyle çok zordur. Bu sebeple oksidatif stresin sonucu olan yan ürünler ölçülmektedir. ROS'un oksidasyon ürünleri, daha kararlı oldukları ve oksidatif stresin büyüklüğünü yansıttığı için büyük ilgi görmektedir. Lipid peroksidasyon oksidatif stres sonucu canlı hücrelerde meydana gelen bir hasardır. ROS'un oluşturduğu oksidatif stres lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipidlerin bozunması sonucu aldehit ürünler ortaya çıkar. Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyon sonucu ortaya çıkan bir yan üründür ve ROS' a göre daha

kararlıdır. 2-Tiyobarbitürik asit (TBA) kiti ile lipid peroksidasyon seviyelerinin ölçülmesi mümkündür. MDA ve tiyobarbitürik asidin reaksiyonu sonucu pembe bir renk veren tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) oluşur. Oluşan rengin yoğunluğu spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılır. Rengin absorbans büyüklüğü ile oksidatif stresin varlığı doğru orantılıdır. Bilinmeyen numunelerdeki MDA içeriği, önceden belirlenmiş MDA standart eğrisi ile karşılaştırılarak belirlenir.



Şekil 3.1 MDA-TBARS reaksiyon şeması (130).

3.6.2. Reaktifler

MDA miktarı ticari olarak satılan OxiSelect TBARS Assay Kit ile belirlenmiştir. Kit içeriği aşağıdaki gibidir.

Malondialdehit (MDA): 1,0 mM Malondialdehide bis (dimetil asetal) - 1,0 mL

Tiyobarbitürik Asit (TBA): 1,0 gram

SDS Lizis Solüsyonu: 20 mL

2X TBA Asid Dilüsyonu: 25 mL

NaOH Solüsyonu: 5 mL

3.6.3. Gruplandırma

Grup 1: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki lipid peroksidasyon düzeyinin belirlenmesi.

Grup 2: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için 24 ve 48 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki lipid peroksidasyon düzeyinin belirlenmesi.

3.6.4. Deneyin yapılışı

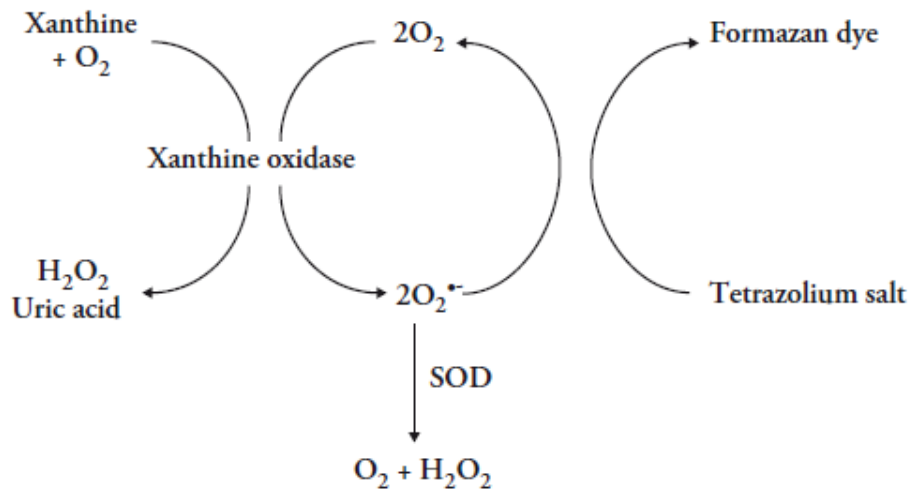
- 2X TBA çözeltisi 1X çözeltili olacak şekilde distile su seyreltildi.
- SDS Lizis Solüsyonu 37°C'de ısıtıldı.
- TBA reaktifi 5,2 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 1X TBA dilüsyonu ile çözülünceye kadar karıştırıldı. TBA çözeltisi NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı.

- Grup 1, grup 2 ve MDA standartları için ependorf tüpler numaralandı. Örneklerden ve standarttan 100 µL eklendi. Üzerlerine 100 µL SDS Lizis Solüsyonu eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika boyunca iyice inkübe edildi.
- Süre sonunda her örneğe ve standarda 250 µL TBA reaktifi eklendi. Isıtma bloğunda 95°C'de en az 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5 dk boyunca buz içinde bekletildi.
- Her örnek ve standarttan ikiyeşerli olarak 200 µL kadar 96 kuyucuklu plaka konuldu. BioTek Synergy H1 Hybrid multi-mode monokromatör floresans mikropalak okuyucusunda 540 nm uyarım ve 590 nm yayılım dalga boylarında floresans okuması yapıldı. Floresans şiddetleri kaydedildi ve MDA standart grafik oluşturularak numunelerdeki protein miktarına ve kontrole oranlanarak sonuçlar verildi.

3.7. Süperoksit ismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

3.7.1. Prensip

Süperoksit Dismutaz (SOD) hücrede ROS'un oluşturabileceği hasarı engellemek için üretilen bir antioksidan enzimdir. Ksantin oksidaz enzimi oksijen molekülünü süper oksit anyonuna çevirir. SOD ise süper oksit anyonunu hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne ayırmaktadır. SOD aktivitesini dolaylı olarak anlayabilmek için tetrazolyum tuzu kullanılır. Tetrazolyum süperoksit anyonu varlığında formazona indirgenir. Formazon oluşumu azaldıkça SOD aktivitesini arttığı yorumlanabilir. Sarı renkteki formazonun absorpsiyonu spektrofotometrede 450 nm'de ölçülür.



Şekil 3. 2. Süperoksit'in ve SOD'un reaksiyon şeması

3.7.2. Gruplandırma

Grup 1: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki SOD aktivitesinin ölçümü.

Grup 2: SA'nın 10 µM dozunun A375 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için 24 ve 48 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki SOD aktivitesinin ölçümü.

3.7.3. Reaktifler

Test Tamponu (10X): 0.1 mM dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA), 0.1 mM hipoksantin içeren 50 mM Tris HCL içerir. pH 8.0' a ayarlandı. Kullanımı sırasında distile su ile 10X'ten 1X konsantrasyonuna seyreltildi. +4°C 'de iki ay muhafaza edilebilir.

Örnek Tamponu (10X): Cayman Kimya'dan hazır olarak temin edildi. Kullanılacağı zaman distile su ile 1X'e seyreltildi ve örnek tamponu +4C 'de altı ay muhafaza edilebilir.

Radikal Dedektör : Tetrazolyum tuzu çözeltisi, -20 C'de saklanır. Cayman Kimya'dan hazır olarak temin edildi.

SOD Standart: SOD (Cu/Zn) en az iki dondurma / çözme döngüsü için stabildir. Cayman Kimya'dan hazır olarak temin edildi.

Ksantin Oksidaz : Seyreltilmiş enzim 1 saat stabildir. Çözülen enzim saklanamaz.

3.7.4. Deneyin yapılışı

- Test tamponu 0.1 mM DTPA, 0.1 mM hipoksantin içeren 50 mM Tris HCL konsantrasyonlarında hazırlandı. pH 8.0' a ayarlandı. 96 kuyucuklu plate için 3 ml test tamponu alındı. Distile su ile 10X'ten 1X konsantrasyonuna seyreltildi
- Radikal dedektöründen 50 µL'ye seyreltilmiş test tamponundan 19,95 mL konuldu. Alüminyum folyo ile kaplandı. Kullanılincaya kadar buz üzerinde bekletildi.
- Örnek tamponundan 2 mL alındı. Üzerine 18 mL distile su konularak konsantrasyonu 10X'ten 1X'e seyreltildi. Ksantin oksidaz enziminden 50 µL alındı ve 1,95 ml seyreltilmiş örnek tamponu ile seyreltildi. Buz üzerinde saklandı.
- SOD aktivite standartları 0-0,050 U/mL arasında hazırlandı. Örnekler ve standartlar ikiyeşerli olarak çalışıldı.
- Standartlar ve grup örneklerin her birinden 10 µL eklendi. Üzerlerine 200 µL seyreltilmiş radikal dedektör eklendi. Kullanılan tüm kuyuculara 20 µL Ksantin

Oksidaz eklendi. Eklendiği saat not edildi ve çalkalayıcıda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. BioTek Synergy H1 Hybrid multi-mode monokromatör floresans mikropak okuyucusunda 450 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Absorbans değerleri kaydedildi ve SOD aktivite lineer standart grafiği oluşturularak numunelerdeki protein miktarına ve kontrole oranlanarak sonuçlar verildi. Ayrıca, MDA ve SOD verilerini oranlayarak Oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplandı.

3.8. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz Graphpad Prism Version 5.03 paket programı kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneyler her grup için 3 tekrarlı olarak yapıldı. Gruplar arasında karşılaştırma yapılırken, parametrik verilerde, Student T-Test ve ANOVA; non-parametrik verilerde Mann-Whitney U ve Kruskal–Wallis testi kullanıldı.

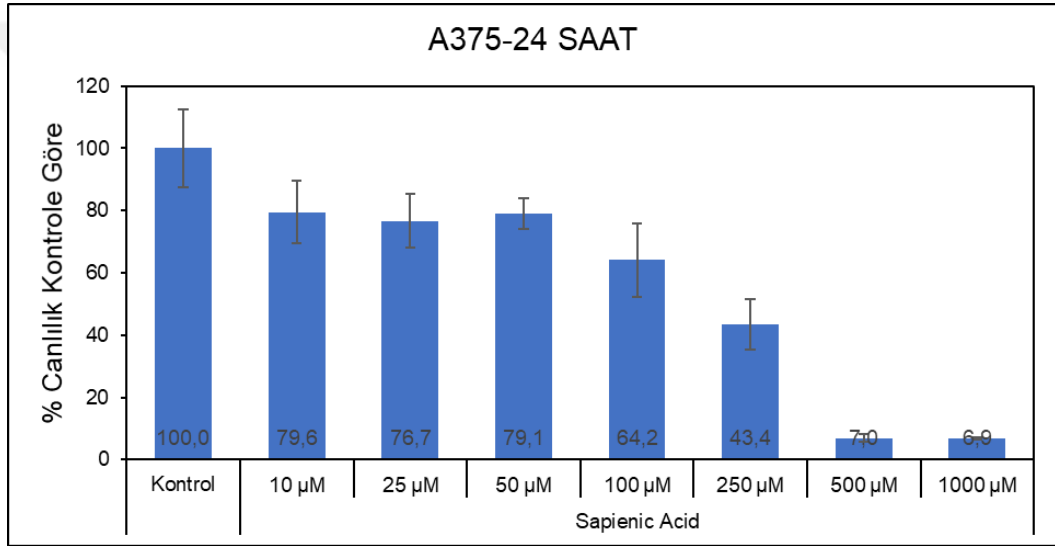
4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Bulguları

SA'nın cilt kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisi, MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid] deneyi ile belirlenmiştir. SA'nın belirli aralıkta değişen konsantrasyonları ile A375 hücreleri 24 ve 48 saat inkübe edildi. MTT sonuçlarına göre 24 ve 48 saat için hücrelerin %50'sini inhibe doz (IC_{50}) hesabı yapılmıştır.

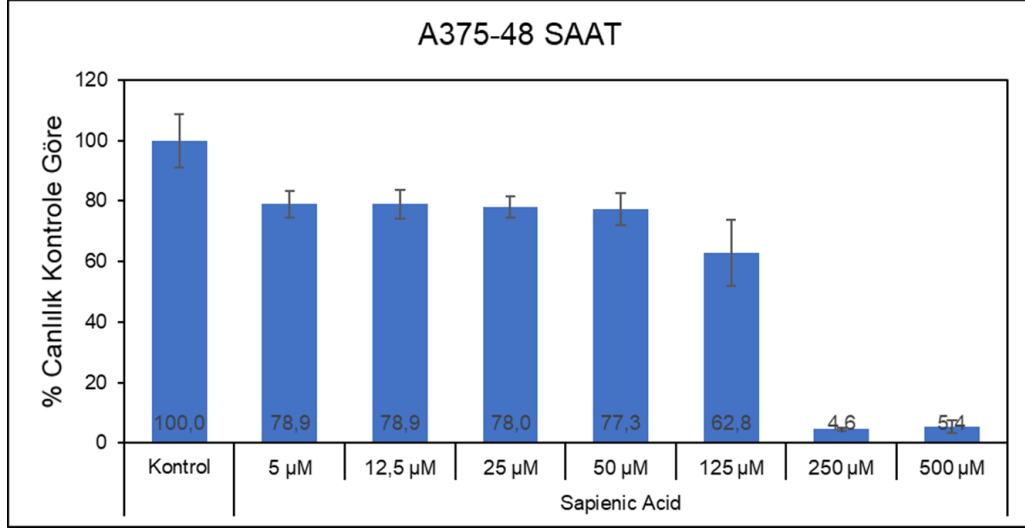
4.1.1. A375 hücrelerinde sapienik asidin sitotoksitesi

A375 hücrelerinde 24 saat için 10; 25; 50; 100; 250; 500 ve 1000 μM SA dozları kullanıldı ve 24 saat için IC_{50} ; 245,1 μM ' dir.



Şekil 4.1 Farklı dozlardaki sapienik asidin A375 hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi

A375 hücrelerinde 48 saat için 5; 12,5; 25; 50; 125; 250 ve 500 μM SA dozları kullanıldı ve 48 saat için IC_{50} ; 132,7 μM ' dir.

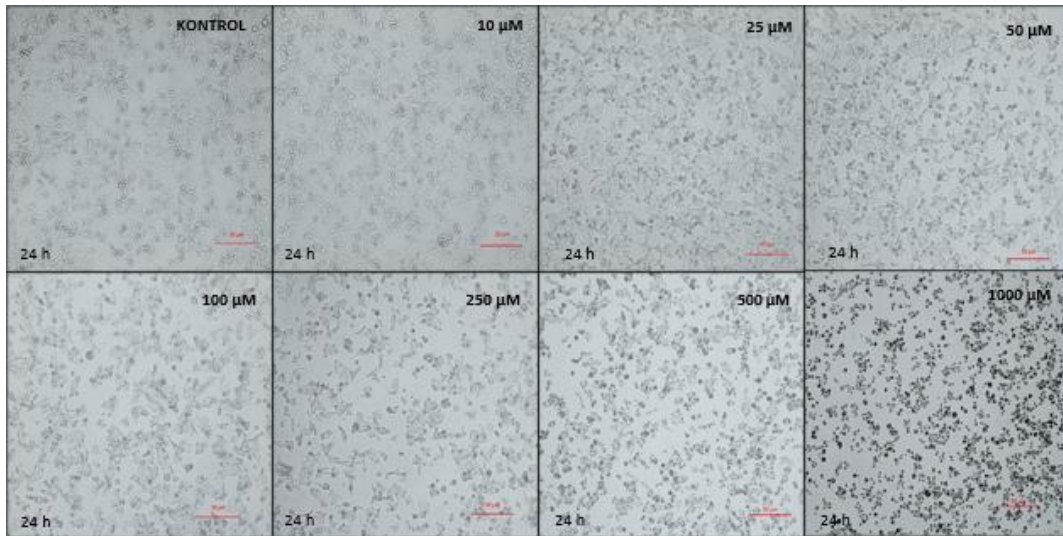


Şekil 4.2 Farklı dozlardaki Sapienik asidin A375 hücrelerinde 48 saat için % canlılık üzerine etkisi

Sitotoksisite çalışmalarında 10 µM SA dozunun 50 µM dozuna kadar olan doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görmedik. Ayrıca çalışmada amacımız düşük fizyolojik dozlarda hücrenin MAPK yolağına olan etkilerini görmek istedik. Dolayısıyla bundan sonraki deneylerde 10 µM SA dozu kullanılmıştır.

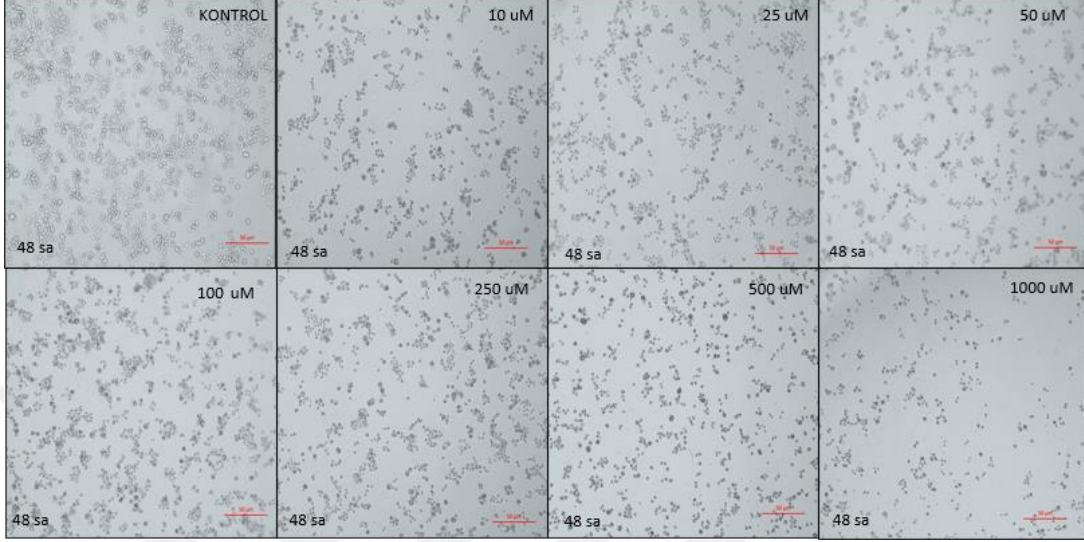
4.1.2. A375 hücrelerinde sapienik asidin etkisinin mikroskopla gözlenmesi

Yaptığımız çalışmada A375 hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki SA etkilerini mikroskop görüntüleriyle kontrol grubu ile karşılaştırdık. İnkübasyonlar 24 saatlik olup SA grubu için 10-1000 µM konsantrasyonlar aralığında uygulanmıştır. Hücre gruplarının fotoğrafları inverted Zeiss Axio Vert.A1 kullanılarak 10X büyütmede görüntülendi. Hücre gruplarının fotoğrafları Şekil 4.3’de gösterilmektedir.



Şekil 4.3 Farklı dozlardaki Sapienik asidin A375 hücrelerinde 24 saat sonunda 10X mikroskop görüntüleri

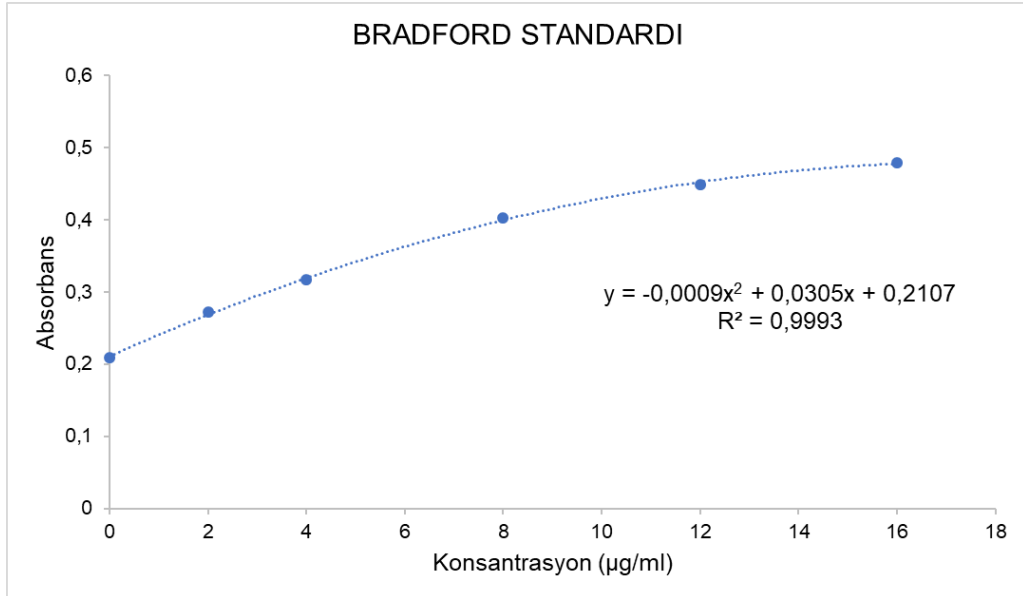
İnkübasyonlar 48 saatlik olup SA grubu için 10-1000 μM konsantrasyonlar aralığında uygulanmıştır. Hücre gruplarının fotoğrafları inverted Zeiss Axio Vert.A1 kullanılarak 10X büyütmede görüntülendi. Hücre gruplarının fotoğrafları Şekil 4.4’de gösterilmektedir.



Şekil 4.4 Farklı dozlardaki Sapienik asidin A375 hücrelerinde 48 saat sonunda 10X mikroskop görüntüleri

4.2. Bradford Protein Tayin Yöntemi ile Total Protein Ölçümü

SA'nın A375 hücre dizilerine farklı sürelerde inkübasyonları sonrası total protein konsantrasyonları ölçüldü. BSA ile ölçülen standart grafiği şekil 4.5’de gösterilmiştir. Her bir deney için yapılan proteinlerin ölçümleri öncesi aşağıdaki gibi BSA standart grafiği çizilerek numunelerdeki protein miktarları hesaplandı.



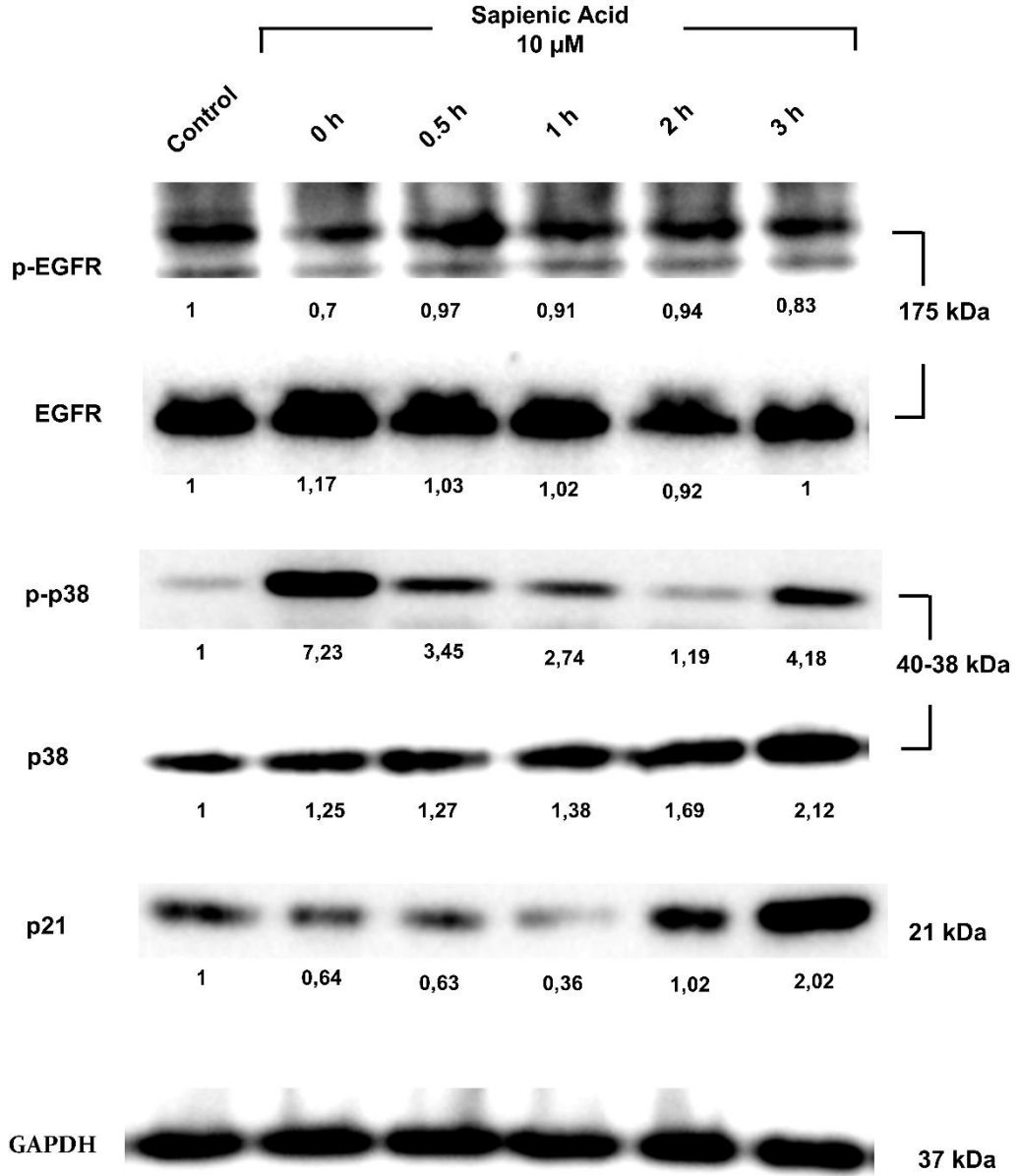
Şekil 4.5 Bradford yöntemiyle standart çizilen absorbansa karşılık konsantrasyon grafiği

4.3. Western Blot Bulguları

Sitotoksosite testine göre 10 μ M SA konsantrasyonu ile A375 hücre dizilerine kısa vade ve uzun vadede inkübe edilecek şekilde iki gruba ayrıldı. Kısa vade (0-3 saat) etkilerini gözlemlemek için grup 1, uzun vade (24-48 saat) etkileri için grup 2 inkübasyonları yapıldı. Bradford ile protein konsantrasyonları ölçüldü. Belirlenen standarda göre yüklenecek protein hacimleri hesaplandı. Konsantrasyon olarak 30 μ g protein yüklendi. Western blot sonucu olarak spesifik protein bantları Syngene G:BOX görüntüleme cihazı tarafından fotoğraflanarak dansitometrik analiz yapıldı.

Grup 1: SA'nın 10 μ M'lık dozu ile A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyonlardan spesifik protein tayinleri yapıldı. Normalizasyon için GAPDH kullanıldı. GAPDH, EGFR, p-EGFR, p38, p-p38 ve p21 görüntüleri şekil 4.6'de gösterilmiştir.

A 375

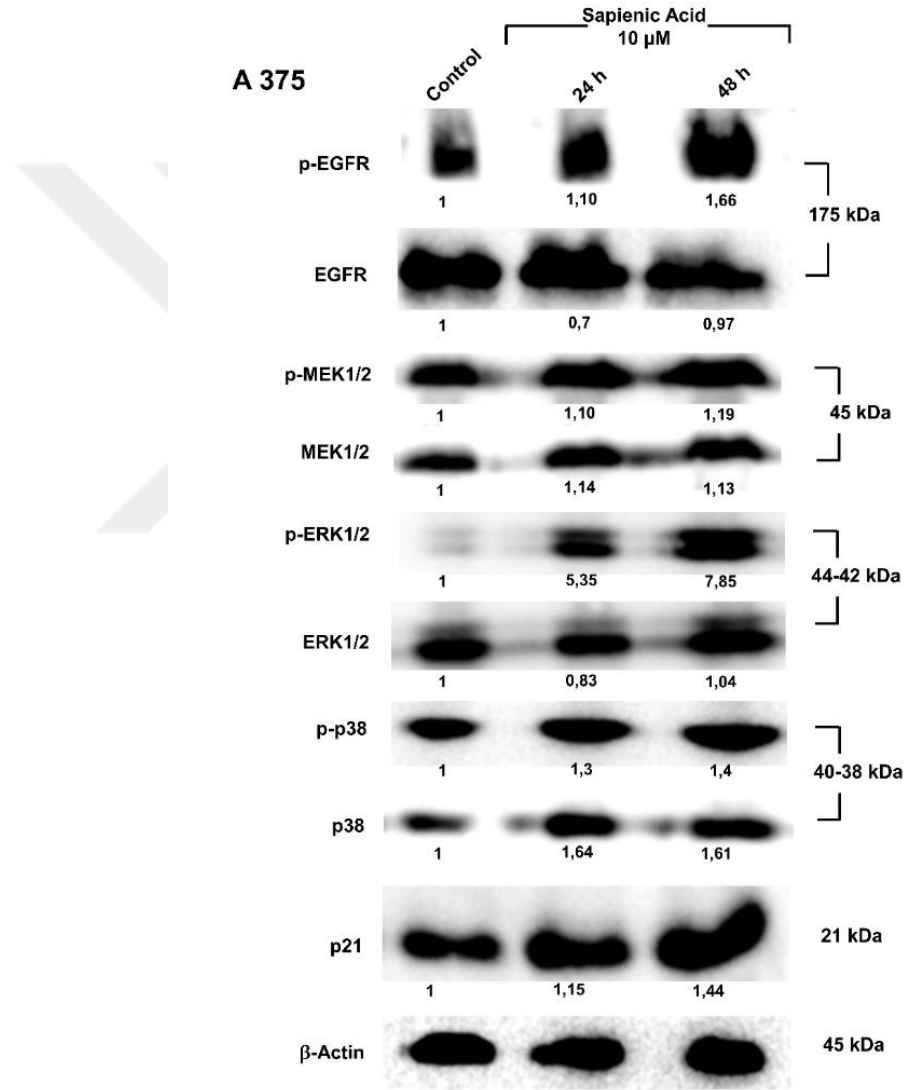


Şekil 4.6 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 0, 30 dk, 1, 2 ve 3 saat inkübasyon ile GAPDH, EGFR, p-EGFR, p38, p-p38 ve p21 proteinlerinin western blot görüntüleri. Üzerindeki sayısal değerler kontrole göre ekspresyon miktarlarını kat miktarını göstermektedir.

EGFR ve p-EGFR tüm zaman aralıklarında kontrole göre ekspresyon düzeyinde değişiklik olmadı. p38 proteini 0. dakikadan itibaren kontrole göre ekspresyon düzeyinde artış görüldü. 3. saatte kontrole göre ekspresyon düzeyi yaklaşık 2 katına çıktı. p-p38 proteini 0. dakikada kontrole göre ekspresyon düzeyi 7 katına çıktı. 0. dakikadaki

ekspresyon artışından sonra 2. saate kadar kontrolün ekspresyon düzeyine kadar düştü. 30. dakikada ekspresyon düzeyi 0. dakikaya göre yarıya indi. Ancak 3. saatte ekspresyon düzeyi kontrole göre 4 katına çıkmıştır. p21 proteini SA ile 3. saatte ekspresyon düzeyi 2 katına çıkmıştır.

Grup 2: SA'nın 10 μ M'lık dozu ile A375 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemek için kontrol, 24 ve 48 saat inkübasyonlardan spesifik protein tayinleri yapıldı. Normalizasyon için β -actin kullanılmıştır. β -actin, p38, p-p38, ERK1/2, p-ERK1/2, MEK, p-MEK, EGFR, p-EGFR, p21 görüntüleri şekil 4.7'de gösterilmiştir.



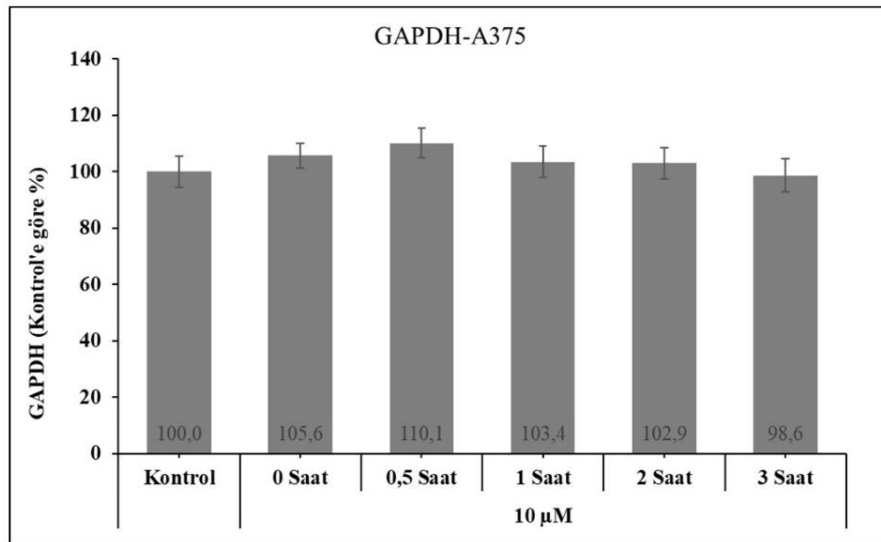
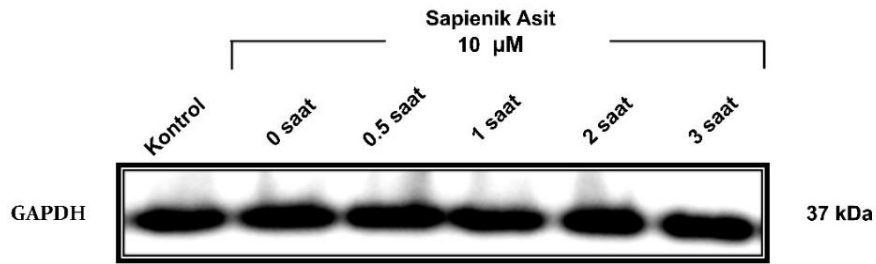
Şekil 4.7 Sapienic Asidin 10 μ M'lık dozu ile A375 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemek için kontrol, 24 ve 48 saat inkübasyon ile β -actin, EGFR, p-EGFR, MEK, p-MEK, ERK1/2, p-ERK1/2, p38, p-p38 ve p21 proteinlerinin western blot görüntüleri. Üzerindeki sayısal değerler kontrole göre ekspresyon miktarlarını kat miktarını göstermektedir.

EGFR tüm zaman aralıklarında kontrole göre ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadı. 24.saatte aktivasyondan kaynaklanan bir azalma gördük. Ancak p-

EGFR ekspresyon düzeyleri 48. Saatte 1,66 kat arttı. MEK1/2 ve p-MEK1/2 proteinlerin ekspresyon düzeyleri tüm zaman aralıklarında incelendiğinde yüksek olan seviyelerinde %10 ila %20'lik değişim görüldü.

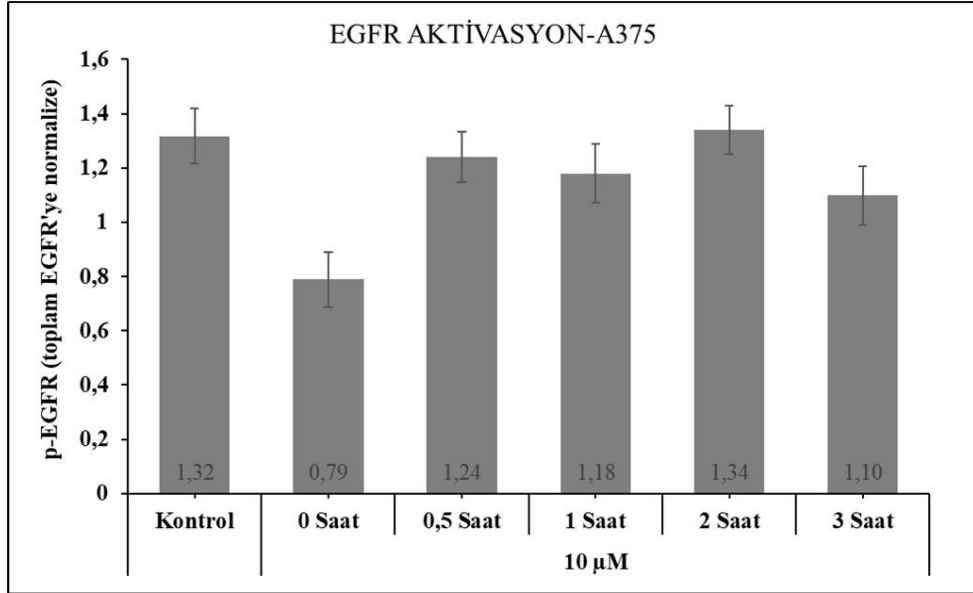
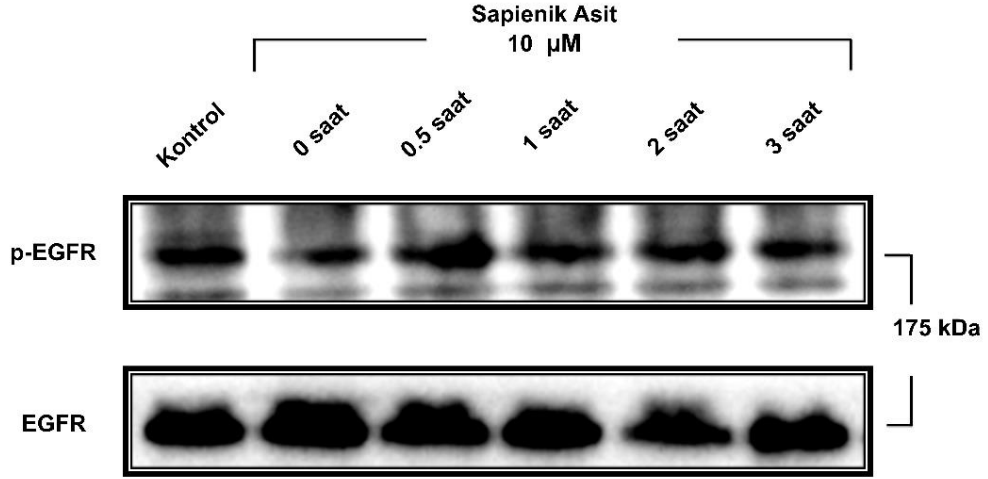
ERK 1/2 tüm zaman aralıklarında kontrole göre ekspresyon 48. saatte düzeyinde değişiklik yokken 24. saatte %17 lik bir azalma bulundu. Diğer taraftan p-ERK1/2 SA ile 24 ve 48.saatte kontrole göre ekspresyon düzeyi sırasıyla 5,35 ve 7,85 kat arttığını bulduk. p38 proteini SA ile 24 ve 48 .saatte kontrole kıyasla ekspresyon düzeyi sırasıyla 1,64 ve 1,61 katına çıktı. p-p38 proteini ise 24 ve 48.saatte kontrole göre ekspresyon düzeyi sırasıyla 1,3 ve 1,4 katına çıktı. p21 proteini SA ile 48. saatte ekspresyon düzeyi 1,44 kattır.

SA'nın 10 μ M'lık dozu ile A375 hücrelerine kısa süreli inkübasyonda GAPDH proteini üzerine etkisi olmadığını gösterdik (Şekil 4.8). Bu yüzden kısa süreli inkübasyonlardan normalizasyon GAPDH proteinine göre yapıldı.



Şekil 4.8 Saptenik asidin 10 μ M'lık dozu ile A375 hücrelerine GAPDH proteini üzerine etkisi.

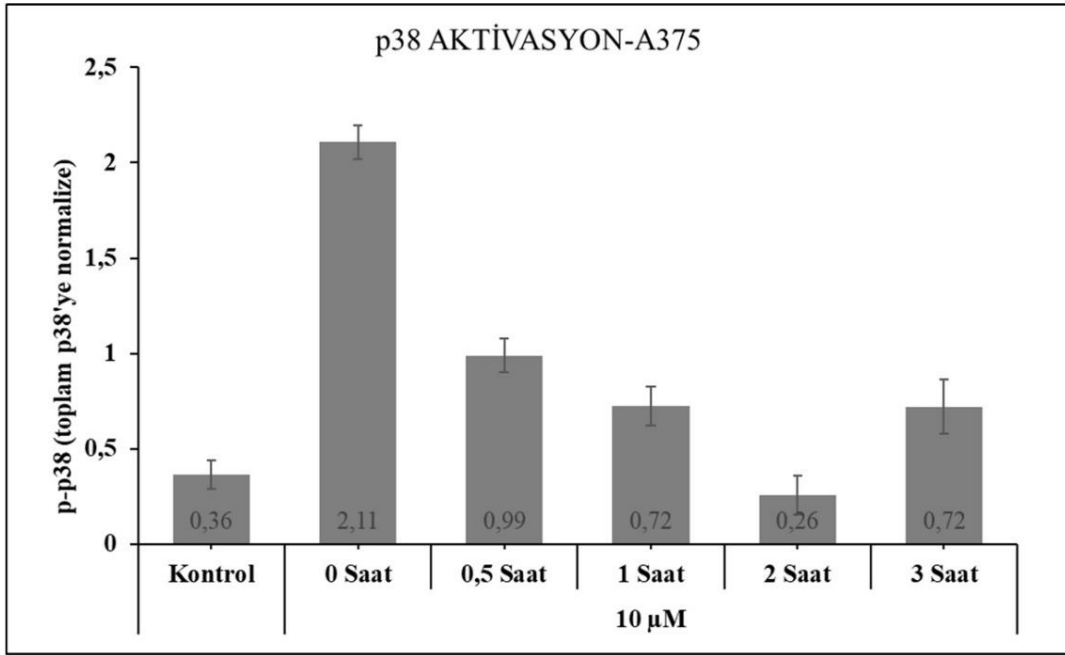
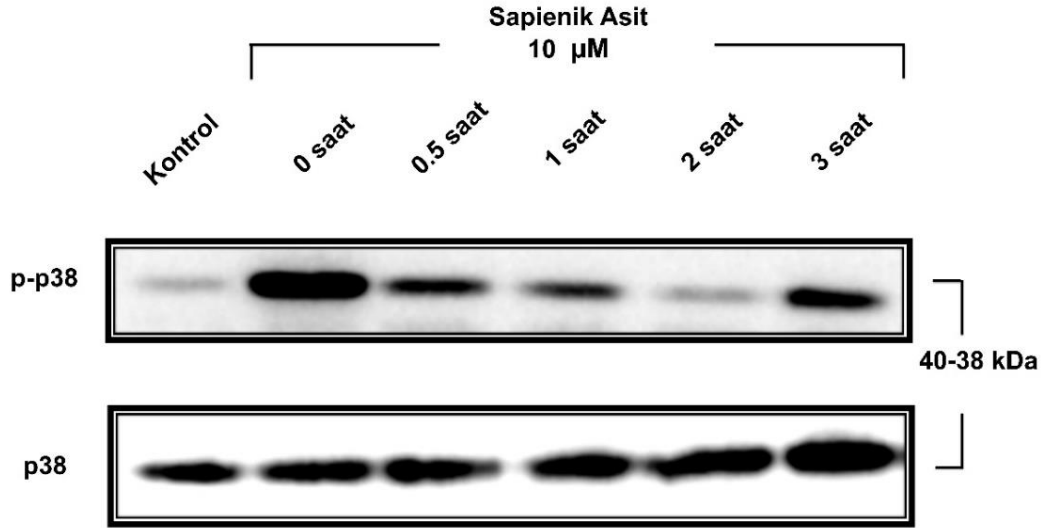
10 μ M'lık dozu ile A375 hücrelerine kısa süreli inkübasyonda EGFR proteinin aktivasyonu üzerindeki etkileri kontrole göre bir miktar düştü (Şekil 4.9)



Şekil 4.9 Sapienic asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine EGFR proteini aktivasyonu üzerine etkisi.

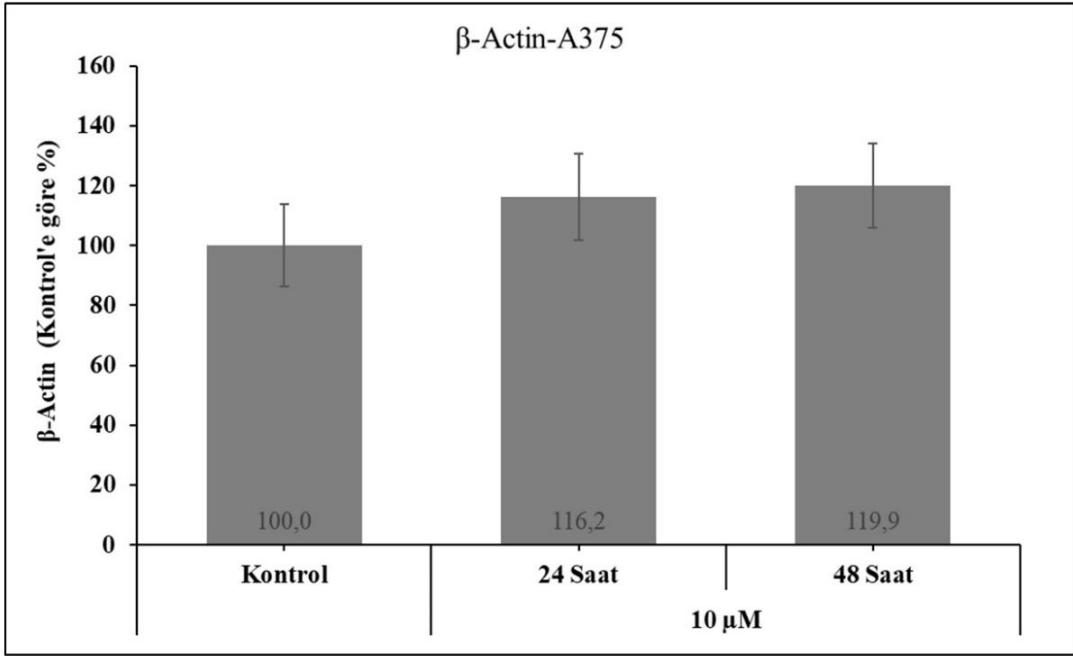
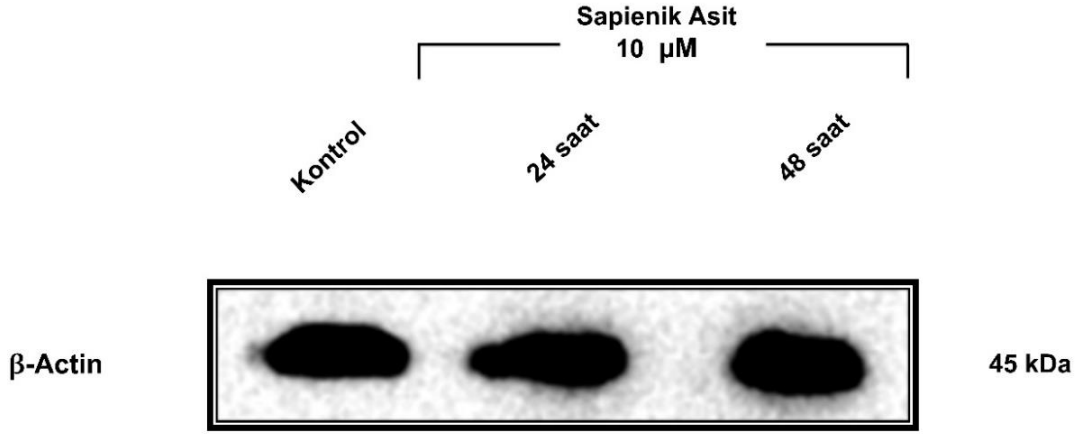
SA'nın etkisi ile EGFR aktivasyonu kontrole göre 0. dakikada bir miktar düştü. Ancak 30 dakikada aktivasyon düzeyi arttı. 1. saatte aktivasyon düzeyi 30. dakikaya göre bir miktar azalırken 2. saatte kontrole göre bir miktar arttı. 3. saatte bir önceki zaman aralığına göre bir miktar düştü.

10 µM'lık SA dozu ile A375 hücrelerine kısa süreli inkübasyonda p38 proteinin aktivasyonu 0. dakikada kontrole göre 5,86 kat arttı. Ancak 0. dakikadan 3.saate kadar aktivasyon kademeli olarak azaldı. 3. saatte p38 aktivasyonu 2. Saate göre 2.76 kat arttı (Şekil 4.10).



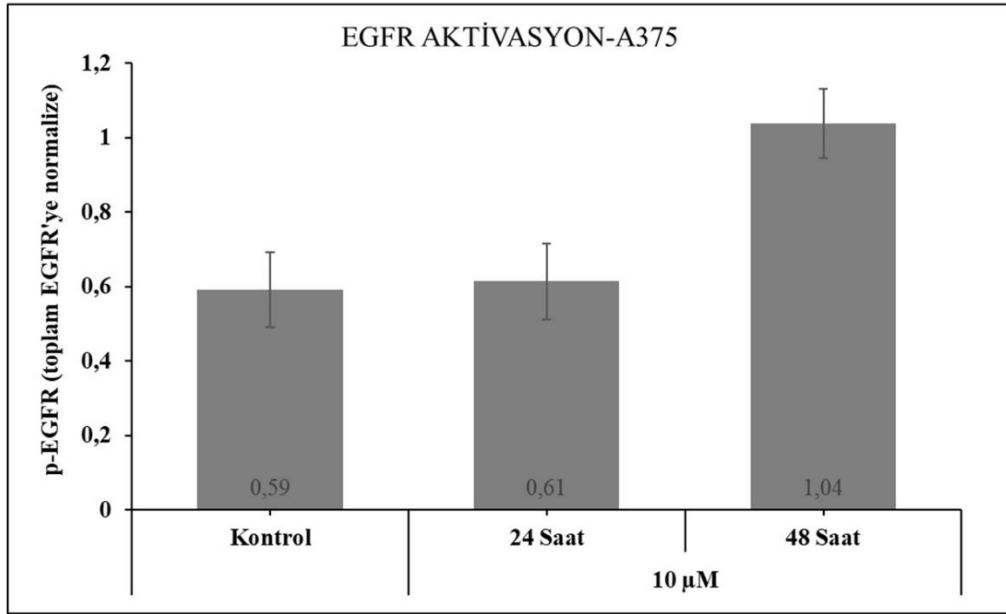
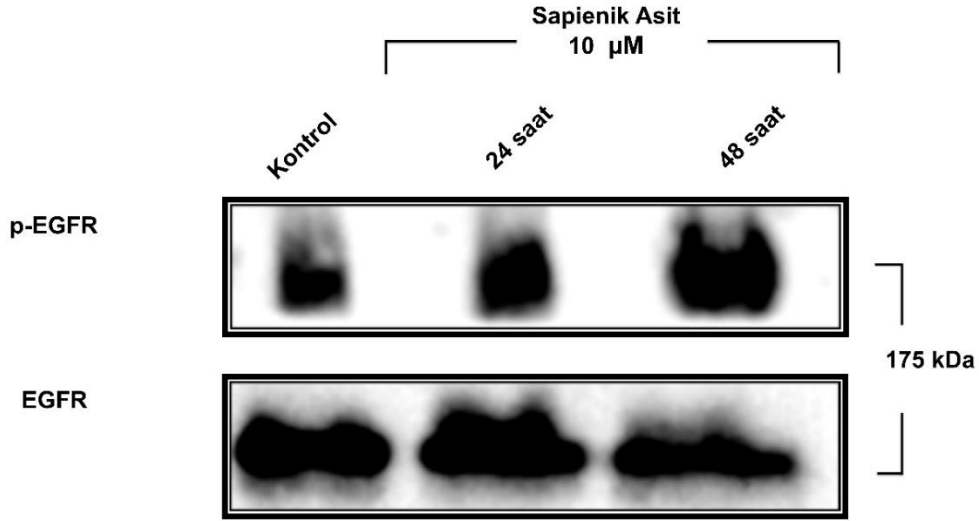
Şekil 4.10 Sapienic asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine p38 proteini aktivasyonu üzerine etkisi.

SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda β-actin proteini üzerine etkisi olmadığını gösterdik (Şekil 4.11). Bu yüzden uzun süreli inkübasyonlardan normalizasyon β-actin proteinine göre yapıldı.



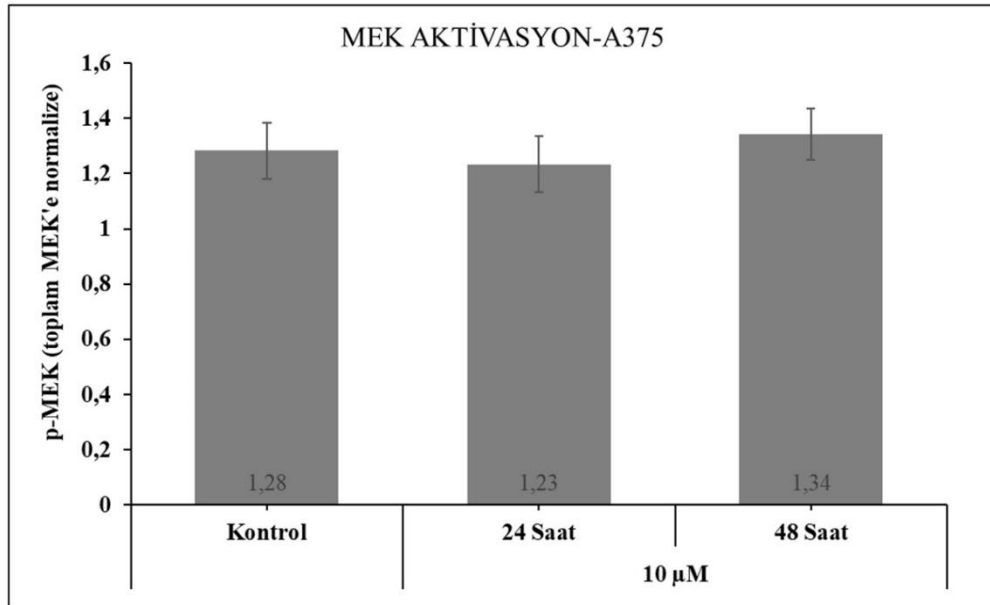
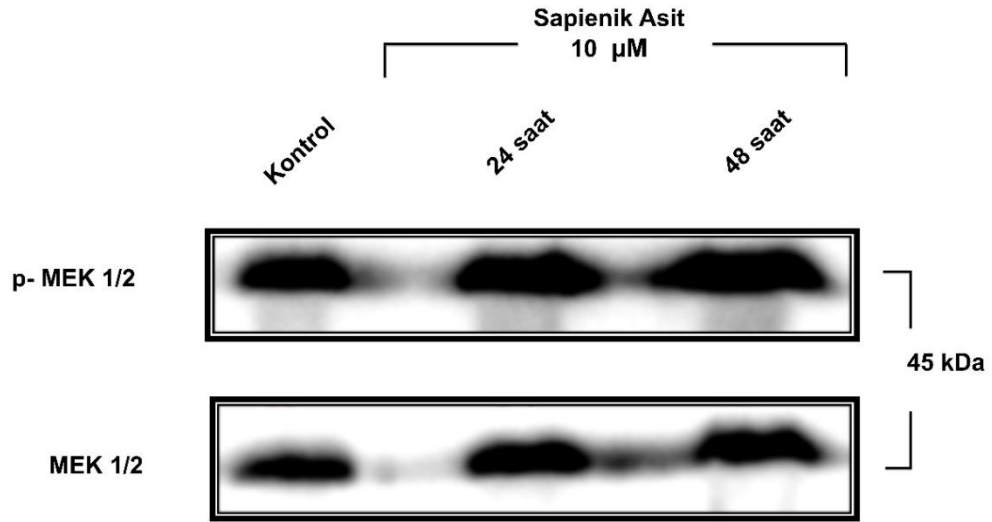
Şekil 4.11 Sapienik asidin 10 μ M'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte β -actin proteini üzerine etkisi.

SA'nın 10 μ M'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda EGFR proteini aktivasyonu üzerindeki etkisi 24. saatte bir miktar arttı. 48. saatte ise yaklaşık olarak iki kat arttırdığını gösterdik. (Şekil 4.12).



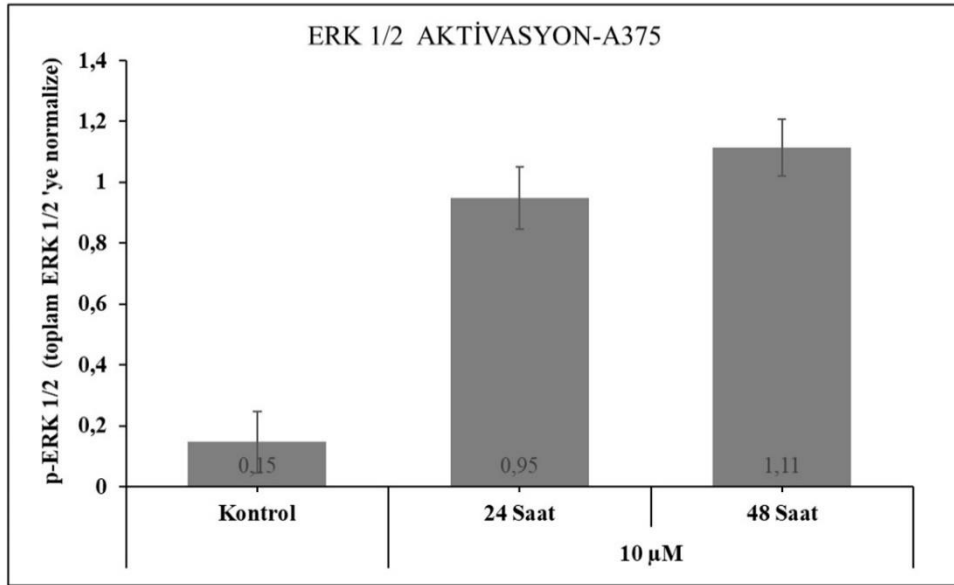
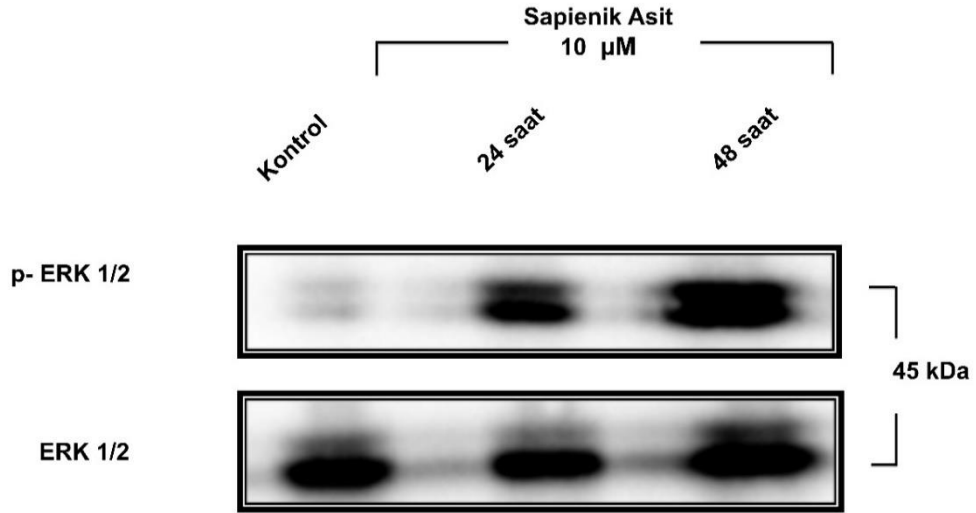
Şekil 4.12 Sapienic asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte EGFR proteini aktivasyonu üzerine etkisi.

SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda MEK proteini aktivasyonu değiştirmediğini gösterdik (Şekil 4.13). Ancak aktivasyon düzeyinde kontrole göre 24. saatte ve 48. saatte anlamlı değişiklik görmedik. Zaten bu hücre hattı yüksek MEK aktivasyonuna sahipti.



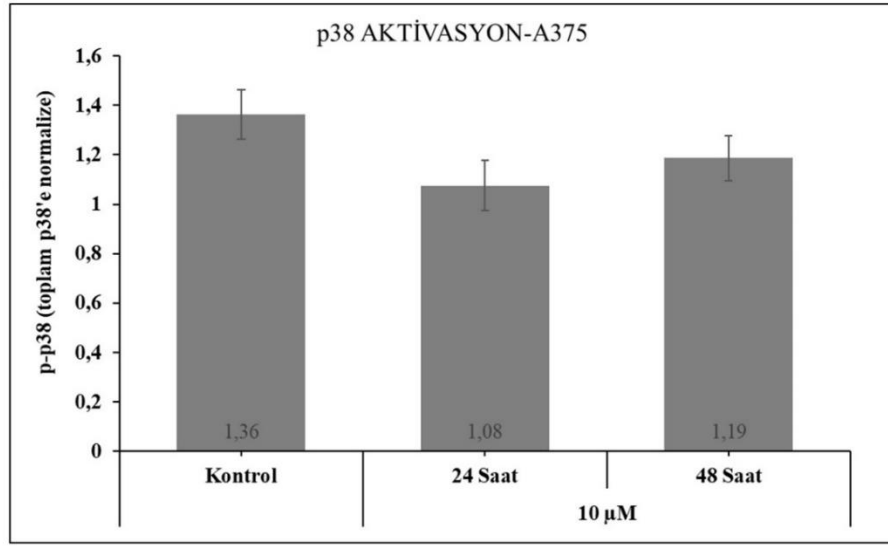
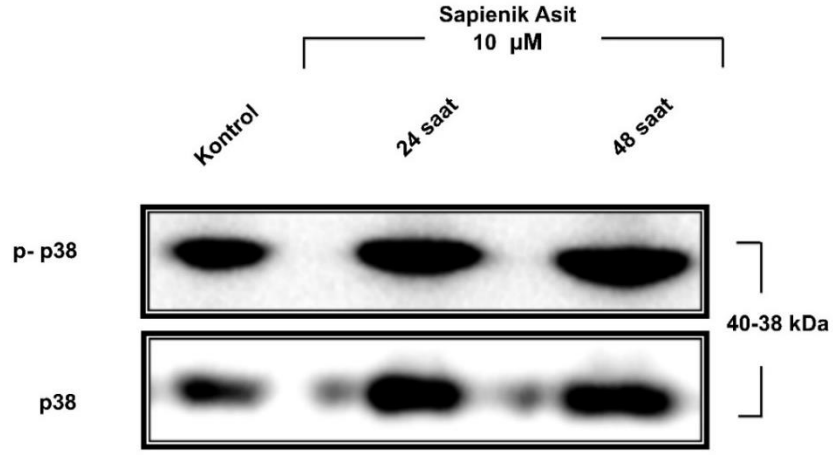
Şekil 4.13 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte MEK proteini aktivasyonu üzerine etkisi.

SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda ERK proteini aktivasyonu 24. saatte kontrole göre yaklaşık 6 kat arttı. 48. Saatte ise kontrole göre yaklaşık olarak 7 kat arttığını gösterdik (Şekil 4.14).



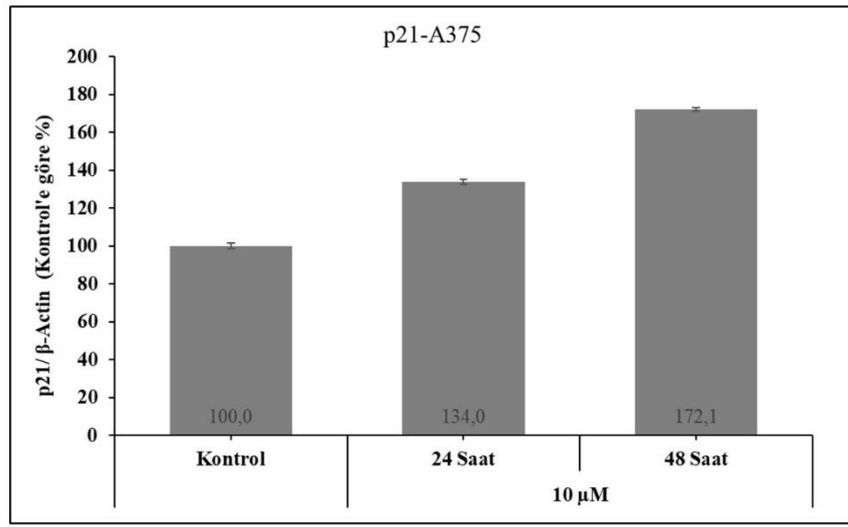
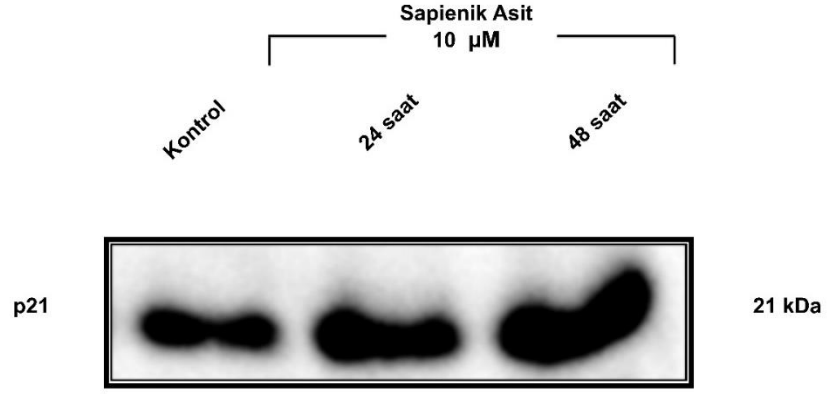
Şekil 4.14 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte ERK proteini aktivasyonu üzerine etkisi.

SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda p-38 proteini aktivasyonu kontrole göre 24. saatte bir miktar azaldığını gösterdik. p-38 protein aktivasyonu 48. saatte ise 24. saate göre bir miktar arttı ama yine kontrole göre anlamlı bir azalma vardı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Sapienik asidin 10 μM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte p38 proteini aktivasyonu üzerine etkisi.

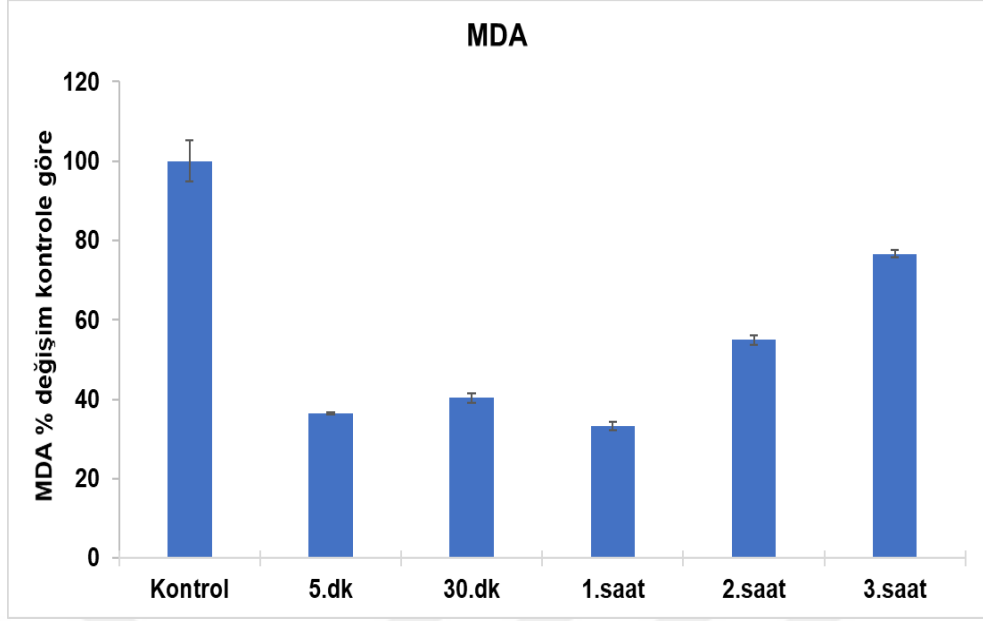
SA'nın 10 μM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda p-21 proteini 24. saatte 1,3 kat ve 48. saatte 1,7 kat arttığını gösterdik (Şekil 4.16). p21'in ekspresyon seviyelerinin yükselmesi birçok hücrede intrinsik apoptozisin uyarıldığı anlamına gelmektedir.



Şekil 4.16 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24 ve 48 saatte p21 proteini üzerine etkisi.

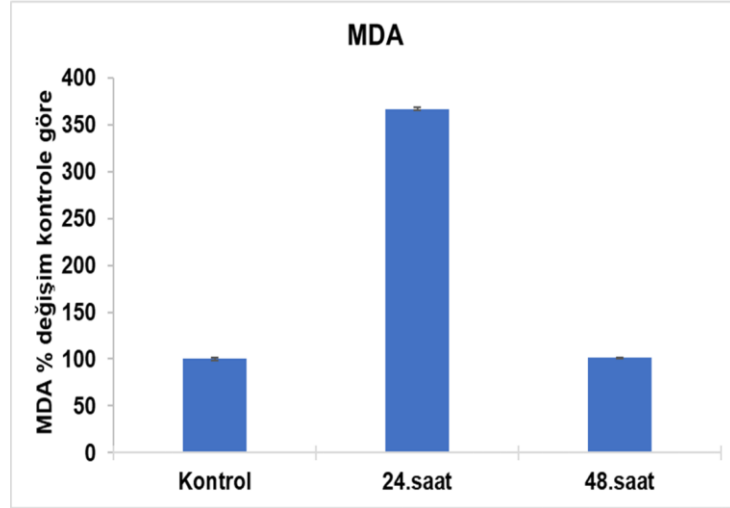
4.4. Lipid Peroksidasyon Bulguları

SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine kısa süreli inkübasyonda MDA seviyelerini gösterdik (Şekil 4.17). Tüm zaman aralıklarında MDA düzeyi kontrole göre azalmıştır. SA'nın ilk anlarından itibaren %60 daha sonrasında %20'lere varan bir azalma gördük. Diğer taraftan kontrole göre azalmış MDA düzeyi 1.saatten sonra 5 ve 30. dakikaya göre artmıştır. SA ile birlikte lipid peroksidasyon ürünü MDA düzeyi 3. saate kadar artmaya devam etmiştir. Ancak hangi saatte olursa olsun kontrole göre düşük olduğunu bulduk. Bu da SA'nın hücrelerde bir antioksidan olarak görev aldığını ve daha sonrasında ise hücreyi strese soktuğunu gösterebilir.



Şekil 4.17 Sapientik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 0-3 saat inkübasyonlarına MDA düzeyleri üzerine etkisi.

SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda MDA seviyelerini gösterdik (Şekil 4.18). MDA düzeyleri kontrole göre 24. saatte 3.5 kat artmıştır. Ancak 48. saatte MDA düzeyi kontrol ile aynı seviyelere düşmüştür.

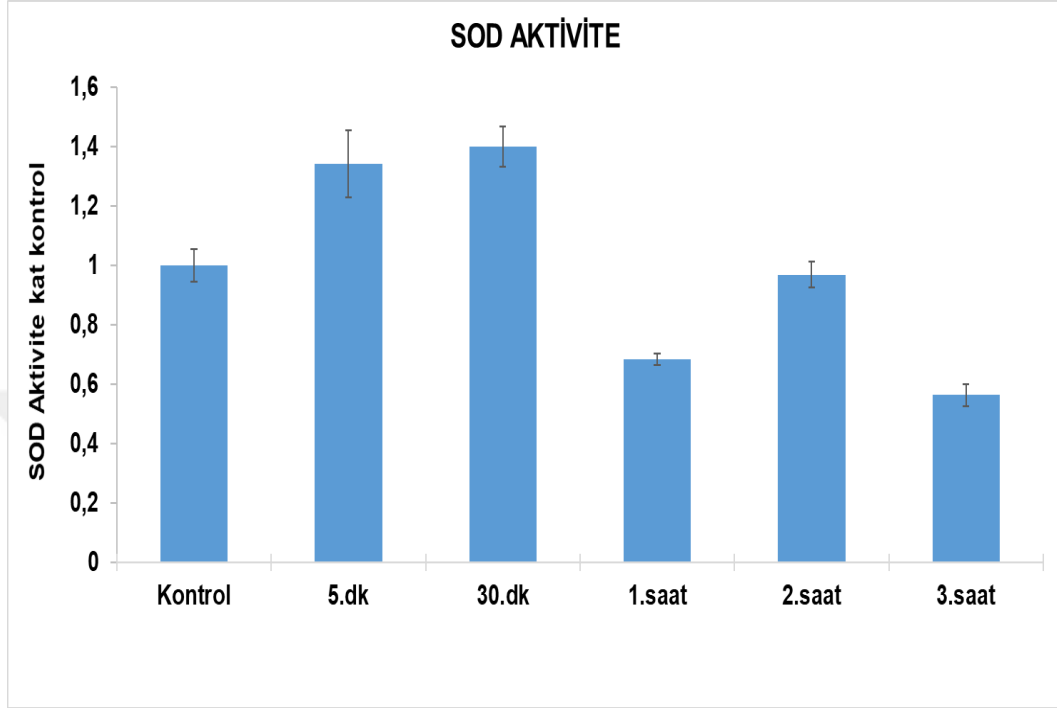


Şekil 4.18 Sapientik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24-48 saat inkübasyonlarına MDA düzeyleri üzerine etkisi.

4.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Bulguları

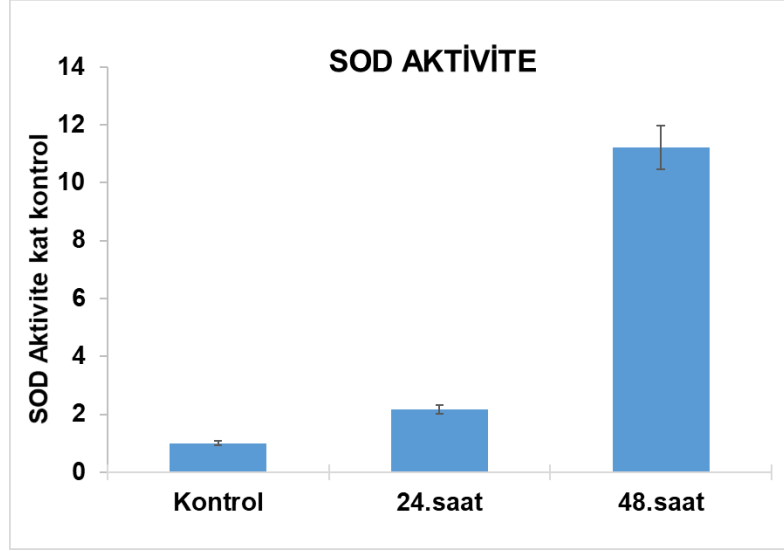
Önemli bir antioksidan enzim olan SOD'un aktivitesini gözleyebilmek için SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine kısa sürede (5 dakika-3 saat) ve uzun vadede (24-48 saat) inkübasyonlar yapıldı. Kısa süreli inkübasyonda SOD aktivite seviyelerini gösterdik (Şekil 4.19). SOD aktivitesi kontrole göre 5. ve 30. dakikada arttı. Ancak 1.

saatte SOD aktivitesi azaldı. Yukarıda şekil 4.17’de gösterildiği gibi 2.saatte MDA düzeyindeki artış sebebiyle dolaylı olarak ROS seviyelerinin yükseldiği gösterildi. SOD aktivite düzeyi 1. saate göre 3. saatte azaldı. Ancak 2. saatte ROS seviyelerinin artmasına rağmen SOD aktivite düzeyi kontrole yaklaştı.



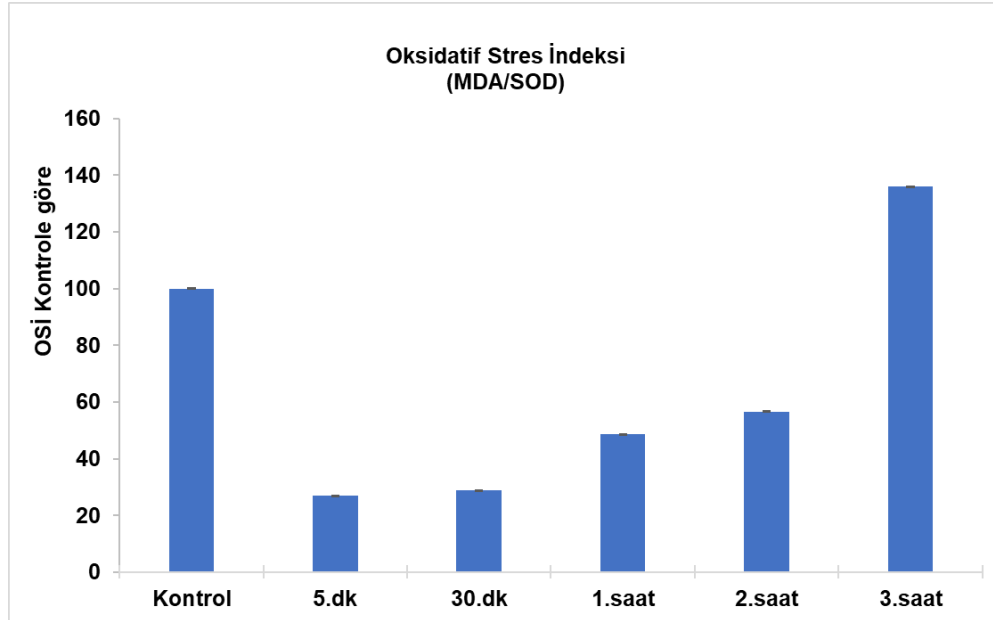
Şekil 4.19 Sapienik asidin 10 μM 'lık dozu ile A375 hücrelerine 0-3 saat inkübasyonlarına SOD aktivitesi üzerine etkisi.

SA'nın 10 μM 'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda SOD aktivite seviyelerini gösterdik (Şekil 4.20). Tüm zaman aralıklarında kontrole göre SOD aktivite düzeyi artmıştır. SOD aktivite düzeyi kontrole göre 24.saatte 2 kat artarken 48. saatte 12 kat arttı.



Şekil 4.20 Sapienik asidin 10 μM 'lık dozu ile A375 hücrelerine 0-3 saat inkübasyonlarına SOD aktivitesi üzerine etkisi.

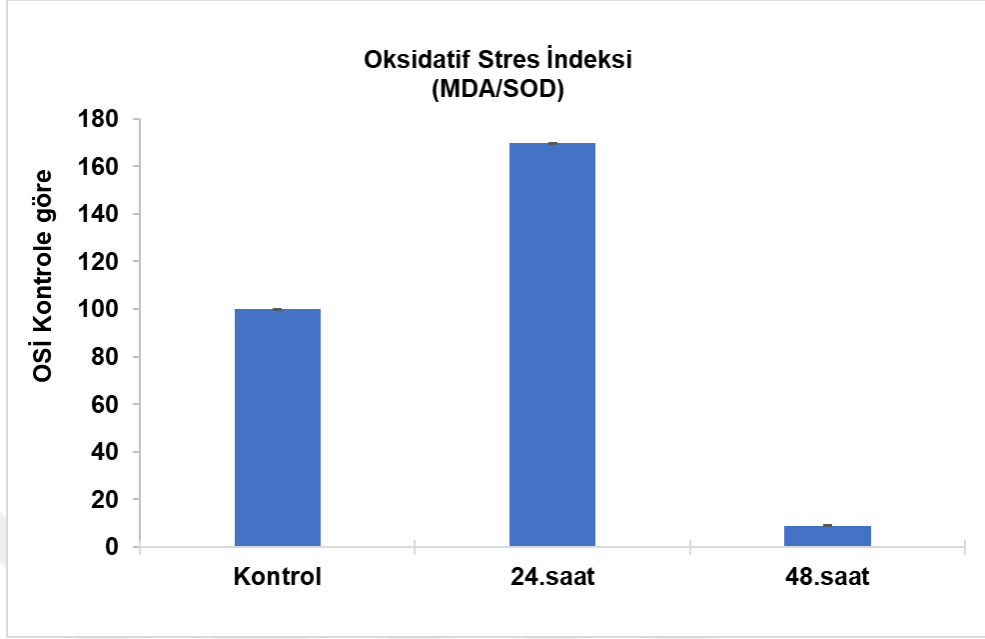
Ayrıca hücrelerdeki MDA ve SOD verilerini oranlayarak oksidatif stres indeksi (OSİ)'yi hesapladık. SA'nın 10 μM 'lık dozu ile A375 hücrelerine kısa süreli inkübasyonda OSİ değerleri verildi (Şekil 4.21). SA kısa süreli inkübasyonların başından itibaren oksidatif stresi azaltıcı bir etki ile %80 azalttığını gösterdik. İlerleyen saatlerde özellikle 3. saatte hücrenin oksidatif stres indeksinin %20 oranında arttığını belirledik. Sonuç olarak SA hücrenin redoks dengesini bozduğu görülebilir.



Şekil 4.21 Sapienik asidin 10 μM 'lık dozu ile A375 hücrelerine 0-3 saat inkübasyonlarının OSİ'ye etkisi

SA uzun süreli inkübasyonların başından itibaren oksidatif stresi arttırıcı bir etki ile 24. saatte %70 arttığını gösterdik. 48. saatte ise hücrenin oksidatif stres indeksinin

%10'lara kadar düştüğünü belirledik. Ancak bu seferde hücre apoptozis indüklenmiş oldu. Sonuç olarak 24. ve 48. saatte SA hücrenin redoks dengesini bozduğu görülebilir.



Şekil 4.22 Sapienik asidin 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine 24-48 saat inkübasyonlarının OSI'ye etkisi

5. TARTIŞMA

Melanom, cilde rengini veren melanin pigmentini üreten melanosit hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan bir kanser tipidir. Genetik, yapısal ve çevresel faktörlerin etkisi ile aktive olmaktadır. Kutanöz melanom insidansı dünya çapında her yıl artmakta olup malign melanom vakalarının %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. UV radyasyonu kutanöz melanom gelişiminde rol oynayan ana çevresel faktördür. Bu sebeple melanom, dünya çapında en çok artışı beklenen kanser türlerinden biridir (20, 131).

Lipidler hücre zarının temel bileşenleri arasındadır ve hücrede birçok biyolojik rolü üstlenen 100.000'den fazla biyoaktif lipid tanımlanmıştır. Lipidler hücre zarında esneklik, plastisite ve dış etkenlere karşı koruyucu görevleri bulunmaktadır. Aynı zamanda enerji depolama ve sinyal iletimi gibi rolleri vardır. Hastalık patolojisinde ve moleküler mekanizmaların düzenlenmesinde sinyal molekülleri olarak gösterilmektedirler. Günümüzde artan araştırmalar ışığında biyoaktif lipidlerin önemi artmıştır (132). Membran lipidlerinin hücre sinyal iletiminde ikincil haberciler olarak hareket ettiği bilinmektedir. Hem hücre zarındaki proteinlerin aktivitelerini hem de hücre zarındaki miktarlarındaki değişimleri sebebiyle hücreler arası haberleşmeyi etkilemektedirler.

Son yıllardaki araştırmalarda lipidlerin hücre sinyalleşmesi sırasında integral membran reseptör sinyalinin düzenlenmesinde önemi vurgulanmıştır. Hücre yüzeyi reseptörlerinin ligand etkileşiminden enzimatik kaskadların hücre içi düzenlenmesine kadar çeşitli fonksiyonel görevleri mevcuttur (133). Tüm bunlar göz önüne alındığında biyoaktif lipidlerin hücre içi yolları etkilemesi beklenmektedir. Lipidlerin yapısında bulunan yağ asitleri türevleri hücre içi sinyal iletiminde rol oynamaktadır. Lipid metabolizması hücrenin çoğalma, farklılaşma, büyüme, hayatta kalma, apoptozis, hareket ve zar homeostazının düzenlenmesi gibi birçok biyolojik olayda görevler üstlenmektedir. Kanser hücrelerinde yağ asidi metabolizmasında yağ asitlerinin eksojen olarak alınımı da kolaylaştırmak için hücre içi regülasyonlar mevcuttur (134). Burada lipidlerin hücredeki kanser prognozunda zıt yöndeki görevlerini de göz önünde bulundurduk. Hem çoğalma ve hayatta kalma hem apoptozis gibi farklı durumları üstlenmektedir. Apoptozis ile ilişkili olarak mitokondriyal membranın geçirgenliği doğrudan lipid metabolizması ile ilişkilidir. Yağ asitleri farklı hücre tiplerinde apoptozu indükleyebilir. Literatürde uzun zincirli yağ asitleri endoplazmik retikulum (ER) stresini indüklediği ve JNK'yı aktive ettiği belirtilmiştir. Diğer yandan hayatta kalma, proliferasyon ve metastatik süreçler içinde yağ

asitlerinin artan lipit biyosentezini gerektirmektedir. Lipit katabolizması da kanser metastazını düzenlemek için sinyal molekülleri olarak hareket eden biyoaktif moleküller üretir (43, 135). Çalışmada yağ asidinin cilt kanseri hücre hattındaki bu iki yönlü etkisine araştırmayı amaçladık. Dolayısıyla, hücre içi sinyal yolağındaki proteinlerin aktivasyonları, ekspresyon düzeyleri ve hücredeki sitotoksik etkilerine odaklandık.

Yağ asitlerinin birçok kanser türündeki etkileri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Literatürde daha çok PUFA'ların kanser ve anti-kanser özellikleri üzerinde durulmaktadır. Meme kanseri hücre hatları üzerinde (MDA-MB-231 ve MCF-7) omega-3 yağ asidi olan PUFA' lar farklı dozlarda verilmiştir. Mevcut bilgilere göre n-3 PUFA'nın doğrudan proliferasyonu inhibe edici etkilere sahip olduğunu göstermektedir (136). Ancak MUFA'ların önemi son zamanlarda vurgulanmaya başlanmıştır. Ayrıca, literatürdeki başka bir çalışmada zeytinyağında bulunan bir MUFA olan oleik asidin (OA) MCF-7 kanser hücrelerinde anti-proliferatif etkileri olduğu belirtilmiştir (137).

MUFA'ların anti-tümörojenik etkilerinin yanı sıra kanser hücrelerinin proliferatif ve metastatik etkilerini arttırdığı yönde yapılan çalışmalarda bulunmaktadır. Literatürde kanserin genellikle 18 karbonlu bir MUFA olan OA ile tedavi seçenekleri diğer MUFA çeşitlerine göre çoğunluktadır. Diğer taraftan, yüksek metastatik karaktere sahip meme ve mide kanserinde maligniteyi destekleyen faktörlerden biri olan AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) OA ile kullanımı yağ asidi oksidasyonunu arttırmasıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını desteklemiştir (138). Xiang ve ark. yaptığı başka bir çalışmada mide kanser hücre hattı, adipositler ile ortak kültüre edilmiştir. Mide kanser hücre hattında yüksek miktarda OA biriktiği ve matriks metalloproteinazın-2'nin artan ekspresyonu ile metastazı arttığı belirtilmiştir. Eksojen olarak OA alımının PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ile metastazı destekleyebileceğini ifade edilmiştir (139).

Yüksek derecede malign olan prostat kanseri hücre hatlarında OA'in FFA etkinliğini arttırarak proliferatif etki yarattığı belirtilmiştir. Ayrıca PI3K/Akt sinyal yolağında Akt fosforilasyon seviyelerini arttırarak etki göstermiştir (140). Yüksek zeytinyağı diyetinde ana lipit olan OA'in rahim ağzı kanserindeki etkisine bakılmıştır. Diyet bazlı OA alımında rahim ağzı kanserinin karsinogenezini uyarılmıştır ve ERK1/2 yolağının aktivasyonunu indüklediği belirtilmiştir (141).

Literatürde MUFA'ların kanser hücre hatlarının hücre içi yolaklarını nasıl etkilediği ile ilgili daha fazla çalışma yapılmalıdır. Çalışmamız genel olarak faydalarından bahsedilen yağ asitlerinin kanser yolaklarını belli dozlarda ne yönde

etkilediği ile ilgili bilgi edinmemize yardımcı olmuştur. Diğer çalışmalardan farklı olarak literatürdeki yeri oldukça az olan cilt sebumunun doğal yapısında üretilen SA' nın malign melanoma hücre hattında incelenmesi doğru bilinen yanırların önüne geçilmesi açısından önemlidir. Kutanöz melanom, malign oldukça agresif karakterde olup A375 hücre hattı bu sınıfa girmektedir (29). Bu sebeple çalışmamızı agresif cilt kanseri olan A375 hücre hattında gerçekleştirdik. Literatürde melanom hücre hattı ve MAPK yolağında SA ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda SA'nın A375 hücre hattında sitotoksik etkisini MTT ile belirleyip hücrelerin IC₅₀ değerini hesapladık. Düşük doz aralığında bile MAPK yolağını ne şekilde etkilediğini belirlemek için bir doz cetveli oluşturduk. Bu doz cetveli IC₅₀ değerini bulmamıza ve en küçük doz aralığında A375 hücre hattı üzerindeki etkilerini görmemiz açısından fayda sağladı. Sitotoksik etkisi 24 ve 48 saat için IC₅₀ değeri sırasıyla 245,1 ve 132,7 µM' dir (Şekil 4.1 ve 4.2). Artan doz aralığında hücre zarında değişim ve sitotoksitenin etkisiyle hücre ölümünün arttığı görüldü. Bir MUFA olan SA'nın OA gibi melanoma hücrelerinde proliferatif etkisi olmadığı ve sitotoksik olduğu belirlendi.

Çalışmamızda SA' in düşük fizyolojik dozlarında hücrenin MAPK yolağına olan etkilerini görmeyi amaçladık. EGFR, p-EGFR, p-38, p-p38, ERK 1/2, p-ERK1/2, MEK 1/2, p-MEK1/2 ve p21 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile belirlendi. Şekil 4.6'da gösterildiği gibi kısa süreli inkübasyonlarda değerlendirdiğimiz proteinlerin ekspresyon seviyelerinin kat miktarları gösterildi. İki bin yirmi bir yılında yayınlanan bir çalışmada, MUFA olan OA'nın A375 hücre hattında farklı doz (100 ve 200 µM) aralıklarında ERK1/2 aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada başka bir melanom hücre hattı olan MNT1 ile karşılaştırılmıştır. Bu hücre hattında ERK ekspresyonu azalmış olmasına rağmen aktivitesinin arttığı görülmüş ama canlılık değişmemiştir (142). Çalışmamızda SA' nın A375 hücre hattında ERK1/2 aktivasyonunun yaklaşık 7,5 kat arttığı bulundu. ERK aktivasyonu hücre canlılığı ile ilişkilendirilmiş olsa da dengesiz ve kontrolsüz ERK1/2 aktivasyonunun apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (143). Çalışmamızda, düşük dozda (10 µM) SA'ın A375 hücre hattında ERK1/2 aktivasyonu üzerinde etkisi yüksek dozda uygulanan başka bir MUFA ile karşılaştırıldığında yüksek bir biyoaktif lipit özelliğine sahip olduğunu göstermiş olduk.

EGFR ve p-EGFR' nin ekspresyon düzeylerine kısa ve uzun süreli inkübasyonlarda bakıldı. EGFR' nin aktivasyonu kısa sürede önemli ölçüde değişiklik göstermediğini ancak, uzun sürede EGFR aktivasyonun zaman aralıklarında

karşılaştırıldığında 2 kat arttığı gözlemlendi. Bu durumda SA'nın A375 hücre hattında uzun süreli inkübasyonda EGFR üzerinde etkisi olduğu gösterildi. Melanomda %70-80 B-Raf mutasyonu görülmektedir. EGFR'nin MAPK yolağı üzerinden indüklenmesi muhtemeldir (106). Bu yüzden EGFR aktivasyonu ERK1/2 aktivasyonu ve p-38 ve p-p38 ekspresyon düzeylerinin artışıyla ilişkilendirilebilir. p38 ve p-p38 ekspresyon düzeyleri kısa ve uzun süreli etkilerinde önemli ölçüde değişiklikler görüldü. SA'nın p-38 aktivasyonu üzerinde etkisi kısa sürede incelendiğinde 0. dakikada hızlı bir artış olduğu görüldü. Ancak zamana bağlı olarak azalma eğilimi göstermektedir. p38 aktivasyonunun 24. saatteki etkisine bakıldığında ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir %20'lik azalma görüldü. p38 aktivasyonunun azalması ile melanosit apoptozisinin uyarıldığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (144). Diğer taraftan başka bir çalışmada, B-RAF inhibitörleri ile muamele edilen A375 hücre hattında 48 saat sonunda p38 aktivasyonun arttığı gösterilmiştir (145). Bir başka çalışmada melanom hücre hattında p38/MK2 yolunun inhibe edilmesi sonucu vasküler invazyonun önlendiği gösterilmiştir. MK2 inhibitörleri ile 28 günlük inkübasyon süreleri sonunda p38 ve p-p38 ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve p38 aktivasyonunun azaldığı bulunmuştur. p38 kötü prognozla ilişkilendirilmiş ve p38 aktivasyonunun dolaylı olarak azalması vasküler invazyonu azalttığı belirtilmiştir (146). Burada, şekil 2.9'da bahsedildiği gibi p38/MAPK'ın tümörjenizde ikili rolü literatürdeki çalışmalarla da desteklenmektedir.

Kutanöz melanom artan p21 ekspresyonu ile ilişkilendirilmektedir (147). Yapılan çalışmalarda, primer melanomlarda ve metastatik nevüslerde p21 seviyelerinin düşük olduğu bildirilmiştir. p21, melanom ilerlemesinde önemli bir rol oynayabilir. Ancak mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (148). Çalışmamızda, SA ile kısa süreli inkübasyonunda 3. saatte p21 proteininin ekspresyon düzeyi 2 kat, uzun süreli inkübasyonunda ise yaklaşık 1,5 kat arttı. Dolayısıyla p21 proteininin ekspresyonu apoptozis ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir. SA'nın A375 hücre hattı ile kısa süreli inkübasyonunda EGFR'de anlamlı ölçüde değişiklik görülmedi. Bu sebeple ERK1/2 ve MEK1/2 'de kısa süreli inkübasyon numunelerinde protein analizi yapılmayıp, uzun süreli etkileri değerlendirdi. Çalışmamızda SA'nın uzun süreli inkübasyonları (Grup 2) sonucunda MEK1/2'nin aktivasyonunun değişmediği gösterildi. MEK1/2-ERK1/2 kaskadın aktivasyonu melanom oluşumunun %50'sinde görülmektedir. Ancak hiperaktivasyonu ile anti-proliferatif etkisi ile çift yönlü mekanizması olduğu vurgulanmaktadır. Güncel bir çalışmada melanom hücre hattında anti-tümörojenik etkili doğal bir bileşik olan Tubeimoside-1'in MEK1/2-ERK1/2

kaskadının hiperaktivesi ile hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (149). Diğer bir çalışmada anti-tümörojenik ilaç, A375 melanom hücre hattında farklı dozlarda 48 saat inkübasyon sonucunda MEK1/2-ERK1/2 kaskadını baskılayarak hücre proliferasyonunu ve metastazı inhibe etmiştir. MEK1/2 ve p-MEK1/2 protein ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirildiğinde MEK1/2 aktivasyonun 48 saat sonunda azaldığı belirtilmiştir (150). Sonuçlarımıza göre de SA'in, MEK1/2-ERK1/2 hiperaktivasyonuna neden olarak melanoma hücrelerinin canlılığını azalttığı ve apoptozise uğramasına neden olduğu görülmektedir.

Literatürde, terapötik ilaçların ve hedeflerin farklı süre ve dozlarda değişen etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. MAPK yolağındaki proteinlerin aktivasyonu veya inhibisyonun iki yönlü sonuçları olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda, SA'in yüksek doz (250-1000 μ M) aralığında uygulanmasının A375 hücrelerinin ölümü ile sonuçlandığı gösterildi. Ancak, yüksek doz ve IC₅₀ değeri dışında düşük dozlarda da SA'in A375 hücre hattında MAPK yolağındaki proteinlerin ekspresyon düzeylerinde ve aktivasyonlarındaki değişimleri konusunda anlamlı sonuçlara ulaşıldı.

Yağ asitlerinin oksidasyonu, artan mitokondriyal ROS üretiminin kaynağıdır. ROS, düşük seviyelerde bir sinyal molekülü iken yüksek seviyelerde organellere, özellikle de mitokondriye zarar verebilmektedir. Lipit peroksidasyonu toksisitesi hem zincir uzunluğu hem de doymamışlık derecesi ile ilgilidir. Zincir ne kadar uzunsa ve doymamışsa peroksidasyona o derece duyarlıdır. Lipit peroksidasyonu sonucu zincirleme ROS oluşturularak ERK ve JNK aktive edilir (135). Çalışmamızda, SA'nın 10 μ M'lık dozu ile A375 hücrelerine kısa süreli inkübasyonda MDA seviyeleri ilk başta (5 dakika) azalırken 2.saatte artmaya başlamıştır. SOD seviyeleri 1.saate göre 2.saatte artmakta olup buna rağmen MDA seviyesi 3.saate kadar artmaya devam etmektedir (şekil 4.19). SA'in artan SOD seviyesine rağmen MDA seviyeleri yükseldiği görüldü. Bu da SA'in lipit peroksidasyonu dışında hücre içindeki yağ asidi metabolizmasını etkilemesi sonucu başka yağ asitlerine dönüşebilme ihtimalini düşündürmektedir. Üretilen yağ asitlerinin hücre stresini artırması beklenebilir. Bunun dışında başka hücre mekanizmalarını etkileyerek hücre homeostazının bozulmasına yol açabileceği düşünülebilir. Bu ihtimallerin doğrulanabilmesi için daha geniş kapsamlı araştırmalar gerekmektedir. SOD, SA'dan kaynaklanan lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ROS ürünlerini ilk başta etkisiz hale getirmektedir. Uzun süreli inkübasyonda ise kontrole göre 24.saatte MDA seviyelerinin 3,5 kat artması geri dönülemez bir oksidatif hasara neden olarak SOD aktivitesini 2 kat arttırdığı belirlenmiştir. MDA seviyesi 48.saatte kontrol düzeyine

inmiştir. SOD seviyeleri ise 24.saatte göre SOD seviyesi 48.saatte yaklaşık 6 kat arttırmıştır. OSİ oranlarına bakıldığında 48.saatte kontrole göre yaklaşık %80 oranında düştüğü gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre 24.saate göre 48.saatte MDA'nın 3,5 kat azalması ve SOD düzeylerinin 6 kat artması SA'nın oksidatif strese etkileri olduğunu göstermektedir. SA'nın kısa vadede hücre içi oksidatif stresi arttırdığı ancak, uzun vadede antioksidan olarak ya da SOD aktivitesini artırıcı etkileri olduğu düşünülebilir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, SA'ın MM hücrelerinde; MAPK yolağı ve bu yolakla ilişkilendirilmiş spesifik proteinler üzerindeki etkilerini incelemek; lipid peroksidasyon ürünü MDA ve SOD düzeylerindeki değişiklikleri sonucu oksidatif stres ve antioksidan etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

- 1) SA'nın cilt kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisi, MTT deneyi ile belirlendi. MTT sonuçlarına göre 24 ve 48 saat için hücrelerin %50'sini inhibe doz (IC₅₀) sırasıyla 245,1 ve 132,7 µM'dır.
- 2) Sitotoksisite çalışmalarında 10 µM SA dozunun 50 µM dozuna kadar olan doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Çalışmada amacımız düşük fizyolojik dozlarda hücrenin MAPK yolağına olan etkilerini görmek istedik. Dolayısıyla bundan sonraki deneylerde 10 µM SA dozu kullanılmıştır.
- 3) SA'nın kısa ve uzun vadedeki etkilerini gözlemlemek için iki grup olarak ayrıldı ve farklı zaman aralıklarında 10µM dozda inkübasyonları yapıldı. Western blot yöntemi ile MAPK yolağındaki seçtiğimiz spesifik proteinlerin ekspresyon ve aktivasyon düzeyleri ölçüldü.
- 4) Bunun sonucunda kısa vadede EGFR ve p-EGFR tüm zaman aralıklarında kontrole göre ekspresyon düzeyinde değişiklik olmadı. EGFR proteinin aktivasyonu üzerindeki etkileri kontrole göre bir miktar düştü.
- 5) p38 proteini 0. dakikadan itibaren kontrole göre ekspresyon düzeyinde artış görüldü. 3. saatte kontrole göre ekspresyon düzeyi yaklaşık 2 katına çıktı. p38 proteinin aktivasyonu 0. dakikada kontrole göre 5,86 kat arttı. Ancak 0. dakikadan 3.saate kadar aktivasyon kademeli olarak azaldı. 3. saatte p-p38 aktivasyonu 2. saate göre 2.76 kat arttı.
- 6) Kısa sürede p21 proteini SA ile 3. saatte ekspresyon düzeyi 2 katına çıkmıştır.
- 7) Uzun sürede ise EGFR tüm zaman aralıklarında kontrole göre ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadı. 24.saatte aktivasyondan kaynaklanan bir azalma gördük. Ancak p-EGFR ekspresyon düzeyleri 48. Saatte 1,66 kat arttı. EGFR proteini aktivasyonu üzerindeki etkisi 24. saatte bir miktar arttı. 48. saatte ise yaklaşık olarak iki kat arttırdığını gösterdik.
- 8) MEK1/2 ve p-MEK1/2 proteinlerin ekspresyon düzeyleri tüm zaman aralıklarında incelendiğinde yüksek olan seviyelerinde %10 ila %20'lik değişim görüldü. ERK

- 1/2 tüm zaman aralıklarında kontrole göre ekspresyon düzeyinde 48. saatte değişiklik yokken 24. saatte %17'lik bir azalma bulundu.
- 9) SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda MEK proteini aktivasyonu değiştirmemiştir. Bu hücre hattı yüksek MEK aktivasyonuna sahip olduğundan elde ettiğimiz sonuçla uyumludur.
- 10) SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda ERK proteini aktivasyonu 24. saatte kontrole göre yaklaşık 6 kat arttı. 48. saatte ise kontrole göre yaklaşık olarak 7 kat arttığını gösterdik. ERK'in hiperaktivasyon olduğu gösterildi.
- 11) p-38 proteini SA ile 24 ve 48 .saatte kontrole kıyasla ekspresyon düzeyi sırasıyla 1,64 ve 1,61 katına çıktı. SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda p-38 proteini aktivasyonu kontrole göre 24. saatte bir miktar azaldığını gösterdik. p-38 protein aktivasyonu 48. saatte ise 24. saate göre bir miktar arttı ama yine kontrole göre anlamlı bir azalma vardı.
- 12) p21 proteini SA ile 48. saatte ekspresyon düzeyi 1,44 kattır. p21'in ekspresyon seviyelerinin yükselmesi birçok hücrede apoptozisin uyarıldığı anlamına gelmektedir.
- 13) SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine kısa ve uzun süreli inkübasyonda MDA seviyeleri ölçüldü. Kısa süreli inkübasyonun tüm zaman aralıklarında MDA düzeyi kontrole göre azalmıştır. SA'nın ilk anlarından itibaren %60 daha sonrasında %20'lere varan bir azalma görüldü. Kontrole göre azalmış MDA düzeyi 1.saatten sonra 5 ve 30. dakikaya göre artmıştır ve 3. saate kadar artmaya devam etmiştir. Tüm zaman aralıklarında kontrole göre düşüktür. Bu da SA'nın hücrelerde bir antioksidan olarak görev aldığını ve daha sonrasında ise hücreyi strese soktuğunu gösterebilir.
- 14) SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine uzun süreli inkübasyonda MDA seviyelerini kontrole göre 24. saatte 3,5 kat artmıştır. Ancak 48. saatte MDA düzeyi kontrol ile aynı seviyelere düşmüştür.
- 15) SOD aktivitesi kontrole göre 5. ve 30. dakikada arttı. Ancak 1. saatte SOD aktivitesi azalmıştır. SOD aktivite düzeyi 1. saate göre 3. saatte azaldı. Ancak 2. saatte ROS seviyelerinin artmasına rağmen SOD aktivite düzeyi kontrole yaklaştı.
- 16) Tüm zaman aralıklarında kontrole göre SOD aktivite düzeyi artmıştır. SOD aktivite düzeyi kontrole göre 24. saatte 2 kat artarken 48. saatte 12 kat arttı.

17) Hücrelerdeki MDA ve SOD verilerini oranlayarak oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplandı. SA'nın 10 µM'lık dozu ile A375 hücrelerine OSİ değerleri kısa süreli inkübasyonların başından itibaren %80 azalmıştır. İlerleyen saatlerde özellikle 3. saatte hücrenin oksidatif stres indeksinin %20 oranında artmıştır.

18) SA uzun süreli inkübasyonların başından itibaren oksidatif stresi arttırıcı bir etki ile 24. saatte %70 artmıştır. 48. saatte ise hücrenin oksidatif stres indeksinin %10'lara kadar düşmüştür.

İnsan cilt sebumunda doğal olarak üretilen SA'in cilt kanserindeki terapötik etkilerini incelemek oldukça önemlidir. Çalışmamızda, SA'nın düşük dozda (10 µM) MAPK yolağında görev alan proteinlerinin ekspresyon ve aktivasyonunu anlamlı ölçüde etkilediği gösterildi. Bulgularımız bütünüyle ele alındığında, cilt kanserinde biyoaktif lipitlerin kemoterapötik tedavisinde çift yönlü yaklaşımın önemli olduğu ve SA'nın melanom tedavisi için yeni ve umut verici bir strateji sunabileceği düşünülebilir.

Araştırmalarımızı destekleyen çalışmalardan bazıları şunlar olabilir:

- 1) Lipit havuzu incelenebilir.
- 2) MAPK yolağındaki JNK kaskadına etkisine bakılabilir.
- 3) Farklı kanser yolaklardaki etkisi araştırılabilir.
- 4) Bazı membran reseptörlerin aktivasyon ve ekspresyonlarına bakılabilir.

7. KAYNAKÇA

1. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2014;43:12-32.
2. https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections_method.pdf?ua=1
(Erişim tarihi: 12.03.2021)
3. Yang K, Fung TT, Nan H. An Epidemiological Review of Diet and Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(10):1115-22.
4. Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ. Early detection and treatment of skin cancer. *Am Fam Physician.* 2000;62(2):357-68, 75-6, 81-2.
5. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos DA, McCubrey JA, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol.* 2018;52(4):1071-80.
6. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. (Erişim tarihi : 12.03.2021)
7. Dika E, Patrizi A, Lambertini M, Manuelpillai N, Fiorentino M, Altimari A, et al. Estrogen Receptors and Melanoma: A Review. *Cells.* 2019;8(11).
8. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2018;34(1):13-24.
9. Karakök G, Güngör H, AB. İlerlemiş Melanomada Kullanılan Güncel Tedavi Yöntemleri. *Turk J Dermatol.* 2016:137-44.
10. Heipieper HJ, Meinhardt F, Segura A. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;229(1):1-7.
11. Lee JM, Lee H, Kang S, Park WJ. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients.* 2016;8(1).
12. Petzelbauer P. Prevention of Melanoma Extravasation as a New Treatment Option Exemplified by p38/MK2 Inhibition. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
13. Naffa R, Vogel L, Hegedus L, Paszty K, Toth S, Kelemen K, et al. P38 MAPK Promotes Migration and Metastatic Activity of BRAF Mutant Melanoma Cells by Inducing Degradation of PMCA4b. *Cells.* 2020;9(5).
14. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health.* 2019;9(4):217-22.
15. Leong SP, Mihm MC, Jr., Murphy GF, Hoon DS, Kashani-Sabet M, Agarwala SS, et al. Progression of cutaneous melanoma: implications for treatment. *Clin Exp Metastasis.* 2012;29(7):775-96.
16. Pavri SN, Clune J, Ariyan S, Narayan D. Malignant Melanoma: Beyond the Basics. *Plast Reconstr Surg.* 2016;138(2):330e-40e.
17. Panda S, Dash S, Besra K, Samantaray S, Pathy PC, Rout N. Clinicopathological study of malignant melanoma in a regional cancer center. *Indian J Cancer.* 2018;55(3):292-6.

18. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
19. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007;445(7130):843-50.
20. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl.* 2013;11(2):81-91.
21. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surg Clin North Am.* 2020;100(1):1-12.
22. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol.* 2014;170(1):11-9.
23. Duncan LM. The classification of cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(3):501-13, ix.
24. MacKie R, Hauschild A, Eggermont A. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of Oncology.* 2009;20:vi1-vi7.
25. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2016-yili-turkiye-kanser-istatistikleri.html> (Erişim tarihi: 25.04.2021)
26. Bellenghi M, Puglisi R, Pontecorvi G, De Feo A, Care A, Mattia G. Sex and Gender Disparities in Melanoma. *Cancers (Basel).* 2020;12(7).
27. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo.* 2014;28(6):1005-11.
28. Morgese F, Sampaolesi C, Torniai M, Conti A, Ranallo N, Giacchetti A, et al. Gender Differences and Outcomes in Melanoma Patients. *Oncol Ther.* 2020;8(1):103-14.
29. Zhu L, Liu Z, Dong R, Wang X, Zhang M, Guo X, et al. MicroRNA-3662 targets ZEB1 and attenuates the invasion of the highly aggressive melanoma cell line A375. *Cancer Manag Res.* 2019;11:5845-56.
30. Rossi S, Cordella M, Tabolacci C, Nassa G, D'Arcangelo D, Senatore C, et al. TNF-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressiveness. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):326.
31. Wasinger C, Hofer A, Spadiut O, Hohenegger M. Amino Acid Signature in Human Melanoma Cell Lines from Different Disease Stages. *Sci Rep.* 2018;8(1):6245.
32. Watts CG, Dieng M, Morton RL, Mann GJ, Menzies SW, Cust AE. Clinical practice guidelines for identification, screening and follow-up of individuals at high risk of primary cutaneous melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2015;172(1):33-47.
33. Chao LX, Patterson SSL, Rademaker AW, Liu D, Kundu RV. Melanoma Perception in People of Color: A Targeted Educational Intervention. *Am J Clin Dermatol.* 2017;18(3):419-27.
34. Padovese V, Franco G, Valenzano M, Pecoraro L, Cammilli M, Petrelli A. Skin cancer risk assessment in dark skinned immigrants: the role of social determinants and ethnicity. *Ethn Health.* 2018;23(6):649-58.
35. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy.* Brisbane (AU)2017.

36. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 2008;84(3):539-49.
37. Moan J, Grigalavicius M, Baturaite Z, Dahlback A, Juzeniene A. The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2015;31(1):26-35.
38. Haluza D, Simic S, Moshhammer H. Temporal and spatial melanoma trends in Austria: an ecological study. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11(1):734-48.
39. Li WQ, Qureshi AA, Ma J, Goldstein AM, Giovannucci EL, Stampfer MJ, et al. Personal history of prostate cancer and increased risk of incident melanoma in the United States. *J Clin Oncol.* 2013;31(35):4394-9.
40. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(11):1366-79.
41. Usher-Smith JA, Emery J, Kassianos AP, Walter FM. Risk prediction models for melanoma: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(8):1450-63.
42. Terheyden P, Krackhardt A, Eigentler T. The Systemic Treatment of Melanoma. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(29-30):497-504.
43. de Carvalho C, Caramujo MJ. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules.* 2018;23(10).
44. Iuchi K, Ema M, Suzuki M, Yokoyama C, Hisatomi H. Oxidized unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in cultured cells. *Mol Med Rep.* 2019;19(4):2767-73.
45. Joris PJ, Mensink RP. Role of cis-Monounsaturated Fatty Acids in the Prevention of Coronary Heart Disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2016;18(7):38.
46. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(5):281-96.
47. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res.* 1985;26(9):1015-35.
48. Escriba PV, Busquets X, Inokuchi J, Balogh G, Torok Z, Horvath I, et al. Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog Lipid Res.* 2015;59:38-53.
49. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):112-24.
50. Ibarguren M, Lopez DJ, Escriba PV. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1838(6):1518-28.
51. Ferreri C, Masi A, Sansone A, Giacometti G, Larocca AV, Menounou G, et al. Fatty Acids in Membranes as Homeostatic, Metabolic and Nutritional Biomarkers: Recent Advancements in Analytics and Diagnostics. *Diagnostics (Basel).* 2016;7(1).

52. Armstrong VT, Brzustowicz MR, Wassall SR, Jenki LJ, Stillwell W. Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes. *Arch Biochem Biophys.* 2003;414(1):74-82.
53. Wassall SR, Stillwell W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(1):24-32.
54. Baran Y, Ulu GT, amp, ccedil, Kiraz Y. Role of Polyunsaturated Fatty Acids in Cancer and Their Use in Cancer Treatment. *Reviews in Clinical Medicine.* 2019;6(3):84-90.
55. Maciel E, Felgueiras J, Silva EMP, Ricardo F, Moreira ASP, Melo T, et al. Lipid remodelling in human melanoma cells in response to UVA exposure. *Photochem Photobiol Sci.* 2017;16(5):744-52.
56. Rocha DM, Bressan J, Hermsdorff HH. The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: a critical review. *Sao Paulo Med J.* 2017;135(2):157-68.
57. Ravaut G, Legiot A, Bergeron KF, Mounier C. Monounsaturated Fatty Acids in Obesity-Related Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
58. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019;25:101084.
59. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94(3):909-50.
60. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011;194(1):7-15.
61. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-62.
62. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049.
63. Çiftçi N. The Role of Oxidative Stress in Cancer: Could Antioxidants Fuel the Progression of Cancer? *Dergi Park.* 2017.
64. Karabulut H, MŞG. Serbest Radikaller. *MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ.* 2016.
65. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016;7(6):e2253.
66. Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell.* 2015;163(3):560-9.
67. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24(5):981-90.
68. Chio IIC, Tuveson DA. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol Med.* 2017;23(5):411-29.
69. Catala A, Diaz M. Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes. *Front Physiol.* 2016;7:423.
70. Pre J. [Lipid peroxidation]. *Pathol Biol (Paris).* 1991;39(7):716-36.

71. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(3):419-25.
72. Pratico D. Lipid peroxidation and the aging process. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2002;2002(50):re5.
73. Heffern CT, Pocivavsek L, Birukova AA, Moldobaeva N, Bochkov VN, Lee KY, et al. Thermodynamic and kinetic investigations of the release of oxidized phospholipids from lipid membranes and its effect on vascular integrity. *Chem Phys Lipids.* 2013;175-176:9-19.
74. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
75. Mason RP, Walter MF, Mason PE. Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(3):419-25.
76. Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J.* 2007;93(12):4225-36.
77. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS. Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:931251.
78. Aslan M, Dogan S, Kucuksayan E. Oxidative stress and potential applications of free radical scavengers in glaucoma. *Redox report : communications in free radical research.* 2013;18(2):76-87.
79. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(7):579-91.
80. Peddireddy V, Siva Prasad B, Gundimeda SD, Penagaluru PR, Mundluru HP. Assessment of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine and malondialdehyde levels as oxidative stress markers and antioxidant status in non-small cell lung cancer. *Biomarkers.* 2012;17(3):261-8.
81. Bhagat SS, Ghone RA, Suryakar AN, Hundekar PS. Lipid peroxidation and antioxidant vitamin status in colorectal cancer patients. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2011;55(1):72-6.
82. Dillioglugil MO, Mekik H, Muezzinoglu B, Ozkan TA, Demir CG, Dillioglugil O. Blood and tissue nitric oxide and malondialdehyde are prognostic indicators of localized prostate cancer. *Int Urol Nephrol.* 2012;44(6):1691-6.
83. Tang L, Wu W, Fu W, Hu Y. The effects of phototherapy and melanocytes on keratinocytes. *Exp Ther Med.* 2018;15(4):3459-66.
84. Hansda S, Ghosh G, Ghosh R. 9-phenyl acridine photosensitizes A375 cells to UVA radiation. *Heliyon.* 2020;6(9):e04733.
85. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations.* 2015.

86. Prouty SM, Pappas A. Sapienic Acid: Species-Specific Fatty Acid Metabolism of the Human Sebaceous Gland. In: Pappas A, editor. *Lipids and Skin Health*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 139-57.
87. Zouboulis CC, Baron JM, Bohm M, Kippenberger S, Kurzen H, Reichrath J, et al. *Frontiers in sebaceous gland biology and pathology*. *Exp Dermatol*. 2008;17(6):542-51.
88. Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A. Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol*. 2009;1(2):68-71.
89. Stewart ME. Sebaceous gland lipids. *Semin Dermatol*. 1992;11(2):100-5.
90. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sapienic-acid>.(Erişim tarihi: 4.02.2021)
91. Gopal SC, Kaki SS, Rao BV, Poornachandra Y, Kumar CG, Narayana Prasad RB. Synthesis of novel lipoamino acid conjugates of sapienic acid and evaluation of their cytotoxicity activities. *J Oleo Sci*. 2014;63(7):717-22.
92. Ge L, Gordon JS, Hsuan C, Stenn K, Prouty SM. Identification of the delta-6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity. *J Invest Dermatol*. 2003;120(5):707-14.
93. Nicolaidis N. Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science*. 1974;186(4158):19-26.
94. Vriens K, Christen S, Parik S, Broekaert D, Yoshinaga K, Talebi A, et al. Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature*. 2019;566(7744):403-6.
95. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(1):50-83.
96. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429(3):403-17.
97. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer*. 2013;4(9-10):401-8.
98. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(11).
99. Wen SY, Cheng SY, Ng SC, Aneja R, Chen CJ, Huang CY, et al. Roles of p38alpha and p38beta mitogenactivated protein kinase isoforms in human malignant melanoma A375 cells. *Int J Mol Med*. 2019;44(6):2123-32.
100. Martinez-Limon A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(6).
101. Puujalka E, Heinz M, Hoesel B, Friedl P, Schweighofer B, Wenzina J, et al. Opposing Roles of JNK and p38 in Lymphangiogenesis in Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2016;136(5):967-77.
102. Khanna P, Yunkunis T, Muddana HS, Peng HH, August A, Dong C. p38 MAP kinase is necessary for melanoma-mediated regulation of VE-cadherin disassembly. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298(5):C1140-50.
103. Igea A, Nebreda AR. The Stress Kinase p38alpha as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Res*. 2015;75(19):3997-4002.

104. Wen SY, Cheng SY, Ng SC, Aneja R, Chen CJ, Huang CY, et al. Roles of p38 α and p38 β mitogen-activated protein kinase isoforms in human malignant melanoma A375 cells. *Int J Mol Med*. 2019;44(6):2123-32.
105. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1213-26.
106. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3291-310.
107. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2014;141(2):160-71.
108. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*. 2010;277(1):2-21.
109. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res*. 2003;63(7):1684-95.
110. Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6).
111. Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer*. 2003;104(5):527-32.
112. Inamdar GS, Madhunapantula SV, Robertson GP. Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(5):624-37.
113. Woessmann W, Chen X, Borkhardt A. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2002;50(5):397-404.
114. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):537-49.
115. Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(3):463-75.
116. Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep*. 2015;35(3).
117. Chang Q, Chen J, Beezhold KJ, Castranova V, Shi X, Chen F. JNK1 activation predicts the prognostic outcome of the human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2009;8:64.
118. Nitta RT, Del Vecchio CA, Chu AH, Mitra SS, Godwin AK, Wong AJ. The role of the c-Jun N-terminal kinase 2-alpha-isoform in non-small cell lung carcinoma tumorigenesis. *Oncogene*. 2011;30(2):234-44.
119. Cellurale C, Sabio G, Kennedy NJ, Das M, Barlow M, Sandy P, et al. Requirement of c-Jun NH(2)-terminal kinase for Ras-initiated tumor formation. *Mol Cell Biol*. 2011;31(7):1565-76.
120. Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog*. 2007;46(8):591-8.

121. Du L, Anderson A, Nguyen K, Ojeda SS, Ortiz-Rivera I, Nguyen TN, et al. JNK2 Is Required for the Tumorigenic Properties of Melanoma Cells. *ACS Chem Biol.* 2019;14(7):1426-35.
122. Ullah S, Chung YC, Hyun CG. Induction of Melanogenesis by Fosfomycin in B16F10 Cells Through the Upregulation of P-JNK and P-p38 Signaling Pathways. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(4).
123. Wang L, Ding QQ, Gao SS, Yang HJ, Wang M, Shi Y, et al. PRDM5 promotes the proliferation and invasion of murine melanoma cells through up-regulating JNK expression. *Cancer Med.* 2016;5(9):2558-66.
124. Grandal MV, Madshus IH. Epidermal growth factor receptor and cancer: control of oncogenic signalling by endocytosis. *J Cell Mol Med.* 2008;12(5A):1527-34.
125. Jones S, Rappoport JZ. Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;51:23-8.
126. Liao CC, Chen SC, Huang HP, Wang CJ. Gallic acid inhibits bladder cancer cell proliferation and migration via regulating fatty acid synthase (FAS). *J Food Drug Anal.* 2018;26(2):620-7.
127. Feng WW, Wilkins O, Bang S, Ung M, Li J, An J, et al. CD36-Mediated Metabolic Rewiring of Breast Cancer Cells Promotes Resistance to HER2-Targeted Therapies. *Cell Rep.* 2019;29(11):3405-20 e5.
128. Seljeset S, Siehler S. Receptor-specific regulation of ERK1/2 activation by members of the "free fatty acid receptor" family. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012;32(4):196-201.
129. Li M, van Esch B, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2018;831:52-9.
130. Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2020(159).
131. Puckett Y, Wilson AM, Farci F, Thevenin C. *Melanoma Pathology.* StatPearls. Treasure Island (FL)2021.
132. Bari M, Bisogno T, Battista N. Bioactive Lipids in Health and Disease. *Biomolecules.* 2020;10(12).
133. Sunshine H, Iruela-Arispe ML. Membrane lipids and cell signaling. *Curr Opin Lipidol.* 2017;28(5):408-13.
134. Koundouros N, Pouligiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer.* 2020;122(1):4-22.
135. Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):924-49.
136. Liu J, Ma DW. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients.* 2014;6(11):5184-223.
137. Hillyer LM, Hucik B, Baracuhy EM, Lin Z, Muller WJ, Robinson LE, et al. Her-2 Breast Cancer Outcomes Are Mitigated by Consuming n-3 Polyunsaturated,

- Saturated, and Monounsaturated Fatty Acids Compared to n-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Nutrients*. 2020;12(12).
138. Li S, Zhou T, Li C, Dai Z, Che D, Yao Y, et al. High metastatic gastric and breast cancer cells consume oleic acid in an AMPK dependent manner. *PLoS One*. 2014;9(5):e97330.
 139. Xiang F, Wu K, Liu Y, Shi L, Wang D, Li G, et al. Omental adipocytes enhance the invasiveness of gastric cancer cells by oleic acid-induced activation of the PI3K-Akt signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;84:14-21.
 140. Liotti A, Cosimato V, Mirra P, Cali G, Conza D, Secondo A, et al. Oleic acid promotes prostate cancer malignant phenotype via the G protein-coupled receptor FFA1/GPR40. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):7367-78.
 141. Yang P, Su C, Luo X, Zeng H, Zhao L, Wei L, et al. Dietary oleic acid-induced CD36 promotes cervical cancer cell growth and metastasis via up-regulation Src/ERK pathway. *Cancer Lett*. 2018;438:76-85.
 142. Brito C, Tomas A, Silva S, Bronze MR, Serra AT, Pojo M. The Impact of Olive Oil Compounds on the Metabolic Reprogramming of Cutaneous Melanoma Cell Models. *Molecules*. 2021;26(2).
 143. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life*. 2006;58(11):621-31.
 144. Tang L, Li J, Fu W, Wu W, Xu J. Suppression of FADS1 induces ROS generation, cell cycle arrest, and apoptosis in melanocytes: implications for vitiligo. *Aging*. 2019;11(24):11829-43.
 145. Li S, Song Y, Quach C, Guo H, Jang GB, Maazi H, et al. Transcriptional regulation of autophagy-lysosomal function in BRAF-driven melanoma progression and chemoresistance. *Nat Commun*. 2019;10(1):1693.
 146. Wenzina J, Holzner S, Puujalka E, Cheng PF, Forsthuber A, Neumuller K, et al. Inhibition of p38/MK2 Signaling Prevents Vascular Invasion of Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2020;140(4):878-90 e5.
 147. Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, Reinikainen M, Alhava EM, Kosma VM. p21(WAF1/CIP1) expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival. *Br J Cancer*. 1999;79(5-6):895-902.
 148. Humbert L, Ghozlan M, Canaff L, Tian J, Lebrun JJ. The leukemia inhibitory factor (LIF) and p21 mediate the TGFbeta tumor suppressive effects in human cutaneous melanoma. *BMC Cancer*. 2015;15:200.
 149. Du J, Dong Z, Tan L, Tan M, Zhang F, Zhang K, et al. Tubeimoside I Inhibits Cell Proliferation and Induces a Partly Disrupted and Cytoprotective Autophagy Through Rapidly Hyperactivation of MEK1/2-ERK1/2 Cascade via Promoting PTP1B in Melanoma. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:607757.
 150. Hu H, Dong Z, Wang X, Bai L, Lei Q, Yang J, et al. Dehydrocorydaline inhibits cell proliferation, migration and invasion via suppressing MEK1/2-ERK1/2 cascade in melanoma. *Onco Targets Ther*. 2019;12:5163-75.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Merve SOYUĞUR

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2017, T.C. Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Lisans
- Yabancı Dil Bilgisi: İngilizce (Orta)

Yayınları ve Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

- **Merve Soyuğur**, Hakan Küçükşayan, Aslınur Sırcan Küçükşayan **Ertan Küçükşayan**. “TGF-Beta’nın Akciğer Kanserinde İmmün Cevapla İlişkili Epigenetik Faktörlere Etkisi” International Aegean Symposiums On Natural & Medical Sciences, February 15-16, 2020 / Izmir, Turkey. ISBN: 978-625-7914-11-6. **Sözlü Sunum.**
- Fatumatuz Zehra Karakuzu, **Merve Soyuğur**, Ahmet Kürşad Sırcan, **Ertan Küçükşayan**, Aslınur Sırcan Küçükşayan. “Doku Mikrodolaşımının Değerlendirilmesi İçin Geliştirilen Optik Cihazın Duyarlılık Ve Kesinlik Analizi” International Aegean Symposiums On Natural & Medical Sciences, February 15-16, 2020 / Izmir, Turkey. ISBN: 978-625-7914-11-6. **Sözlü Sunum.**
- **Merve Soyuğur**, Hakan Küçükşayan, Aslınur Sırcan Küçükşayan, **Ertan Küçükşayan**. Pankreas Kanseri Hücrelerinde İmmün Cevabı Regüle Eden Epigenetik Faktörlere TGF-Beta’nın Etkisi. V. International Congress on Natural and Health Sciences (ICNHS-2019) Adana, Turkey. ISBN: 978-605-7758-51-4. December 13-15, 2019. **Sözlü Sunum.**
- Fatumatuz Zehra Karakuzu, **Merve Soyuğur**, **Ertan Küçükşayan**, Ahmet Kürşad Sırcan, Aslınur Sırcan Küçükşayan. Doku Oksijen Saturasyonu Ölçümü İçin Geliştirilen Optik Cihazın Prob tasarımı ve Kalibrasyonu. V. International Congress on Natural and Health Sciences (ICNHS-2019) Adana, Turkey. ISBN: 978-605-7758-51-4. December 13-15, 2019. **Sözlü Sunum.**
- **Küçükşayan E., Soyuğur M.**, Temel Tıp Bilimlerinde Tıbbi Tanı ve Tedavi Yöntemleri-Kitap Bölümü-IV. BÖLÜM. Kanser Tedavisinde Proprotein Konvertazların Yeri.