

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

CROCUS SATIVUS L. (SAFRAN)'IN CİLT KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ece DOĞAN

**TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Halil Mahir KAPLAN**

ADANA-2022

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

CROCUS SATIVUS L. (SAFRAN)'IN CİLT KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ece DOĞAN

**TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMANI
Doç. Dr. Halil Mahir KAPLAN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2020-12610 Nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2022

KABUL VE ONAY



ETİK BEYAN



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması sırasında ve hücre kültürü çalışmalarının yürütülmesinde desteğini ve yardımını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Halil Mahir KAPLAN'a, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Fatma Peyman ERTUĞ'a, tez çalışmalarının yürütülmesi sırasında destek olan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AnaBilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK'e ve bölümdeki diğer uzman arkadaşlarıma, manevi destekleri için tüm dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her alanında olduğu gibi eğitim hayatım boyunca da maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olduğunu hissettiren babam Vet. Hekimi İsa DOĞAN'a, annem Demet DOĞAN'a, kardeşlerim Vet. Hekimi Dr. Barışhan DOĞAN'a ve Vet. Hekimi Saniye DOĞAN'a sabrı, desteği ve yardımları için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Crocus sativus L. (Safran) Bitkisi ile İlgili Genel Bilgiler	3
2.2. Genotoksisite ve Kanser Gelişimi	6
2.2.1. Kanser	9
2.2.2. Cilt Kanseri	11
2.3. Apoptoz	11
2.3.1. Bcl-2/Bax Gen Ailesi	14
2.3.2. Kaspazlar	15
2.3.3. Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF) Yolağı	16
2.3.4. GRP78 ve GADD153 Proteinleri	17
2.3.5. Wee 1 Proteini	17
2.4. ELISA Yöntemi	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Safran Bitki Ekstraktının Hazırlanması	19
3.2. Hücre kültürü	19
3.2.1. MTT Testi	19
3.2.2. Doku homojenizasyonu	20
3.2.3. Protein Miktar Tayini	20
3.3. ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Testi	20

3.3.1. Kaspaz-3 Protein Miktar Tayini.....	20
3.3.2. Bax protein miktar tayini	21
3.3.3. Bcl-2 protein Miktar Tayini	21
3.3.4. Wee 1 Miktar Tayini	21
3.3.5. AIF Protein Miktar Tayini	22
3.3.6. GADD153 Miktar Tayini.....	22
3.3.7. GRP78 Miktar Tayini.....	23
3.4. İstatistiksel Analiz.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları	24
4.2. Safranin Bcl-2 Düzeyine Etkisi.....	24
4.3. Safranin Bax Proteinini Üzerine Etkisi	25
4.4. Safranin Kaspaz-3 Düzeyine Etkisi	25
4.5. Safranin wee1, AIF, gadd153 ve grp78 Proteinleri Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	26
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	30
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Crocus sativus L. (safran) bitkisinin morfolojik yapısı.....	3
Şekil 2. Safran bitkisinin kimyasal bileşimi	4
Şekil 3. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları	7
Şekil 4. Oksidatif hasar ve sonuçları	9
Şekil 5. Karsinogenez aşamaları	10
Şekil 6. Apoptozun evreleri	12
Şekil 7. Azalan apoptoz seviyesi ve kanser ilişkisi	13
Şekil 8. Bcl-2 ve Bax gen ailesinin apoptozdaki rolü	14
Şekil 9. Kaspaz yolağı ile apoptoz	15
Şekil 10. AIF yolağı ile apoptoz	16
Şekil 11. ELISA yöntemi prensibi	18
Şekil 12. Safranin melanom cilt kanserindeki MTT sonuçları	24
Şekil 13. Safranin melanom cilt kanserindeki bcl-2 ekspresyonuna etkisi	24
Şekil 14. Safranin melanom cilt kanserindeki Bax ekspresyonuna etkisi	25
Şekil 15. Safranin melanom cilt kanserindeki Kaspaz-3 proteini ekspresyonuna etkisi	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No:

Sayfa No:

Çizelge 1. Reaktif Oksijen Türleri.....	8
Çizelge 2. Safranın wee 1, AIF, gadd153 ve grp78 proteinlerinin ekspresyonları üzerine etkileri.....	26



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
APAF1	: Apoptotik Peptidaz Aktive Edici Faktör 1
Bax	: Bcl-2-associated X protein
BCL-2	: B hücreli lenfoma 2
cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece
DMEM	: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	: Endoplazmik retikulum
FBS	: Fetal Bovin Serum
GADD153	: Büyüme İldürdürücü ve DNA Hasarını İndükleyen Gen
GRP78	: Glikoz İle Regüle Protein
KASPAZ	: Sistein Aspartat Spesifik Proteaz
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
MTT	: 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide
nm	: Nanometre
pg	: Pikogram
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon Deney
RPM	: Dakikada Devir Sayısı

ÖZET

Crocus sativus L. (Safran)'ın Cilt Kanseri Üzerine Etkisinin Araştırılması

Crocus sativus L. (safran)'ın, gerek alternatif tıpta, gerekse modern tıpta tedavi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Başta kardiyovasküler sistem tedavisinde olmak üzere pulmoner sistem problemlerinin giderilmesinde, gastrointestinal sistem problemlerinin giderilmesinde, gut semptomlarında, anoreksi, uykusuzluk ve erektil disfonksiyon gibi klinik bulguların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Son zamanlarda sıklıkla bazı kanser türlerinin tedavisinde, hipertansiyon ve yüksek kolesterolün yönetilmesinde ve bazı klinik kullanıma özel saç toniklerinde de kullanıldığı bilinmektedir. Bu bağlamda, özellikle cilt kanseri hücrelerinin safranla muamelesinin hücre canlılığı ile *kaspaz-3*, *bax*, *bcl-2*, *wee1*, *gadd153*, *grp78* ve *AIF* (apoptoz indükleyici faktör) protein düzeylerini ve aktivitelerini nasıl etkileyeceğinin araştırılmasını planlanmıştır. Bu amaçla, insan cilt kanseri hücre kültürü hazırlanmış ve bu hücreleri safran ile muamele edildikten sonra hücrelerdeki *kaspaz-3*, *bax*, *bcl-2*, *wee1*, *gadd153*, *grp78* ve *AIF* protein düzeylerinin ELISA ile analizini gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız analizler sonucunda artan safran muamelesi sonucu cilt kanseri hücre canlılığının azaldığı bulunmuştur. Apoptozun azaldığını gösteren önemli göstergelerden *bcl-2* protein düzeyi azalırken bunun aksine kanser hücresi ölümünün arttığını ifade eden *bax*, *kaspaz-3*, *gadd153*, *grp78*, *AIF* ve *wee1* düzeyleri ise yükselmiştir. Bu çalışma, safranın özellikle cilt kanseri tedavisinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Safranın, kanser hücresini ölüme yönlendirirken çeşitli kemoterapötiklerle sinerjistik etki gösterebileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Sözcükler: *bax*, *bcl-2*, Cilt Kanseri, *kaspaz-3*, Safran.

ABSTRACT

Investigation Of The Effect Of *Crocus sativus* L. (Saffron) On Skin Cancer

***Crocus sativus* L. (saffron) is known to be used for treatment in both alternative medicine and modern medicine. It is known to be used in the treatment of primarily cardiovascular system, pulmonary system problems, gastrointestinal system problems, gout symptoms and treatment of clinical findings such as anorexia, insomnia and erectile dysfunction. Recently, it is known that it is frequently used in the treatment of some types of cancer, in the management of hypertension and high cholesterol and in some clinical use-specific hair tonics. In this context, it is planned to investigate how the treatment of skin cancer cells with saffron will affect cell viability, caspase 3, bax, bcl-2, wee1, gadd153, grp78 and AIF (apoptosis inducing factor) protein levels and activities. For this purpose, we prepared human skin cancer cell culture and after treating these cells with saffron, caspase-3, bax, bcl-2, wee1, gadd153, grp78 and AIF protein levels were analyzed by ELISA. As a result of our analysis, it was found that skin cancer cell viability decreased as a result of increased saffron treatment. While the level of bcl-2 protein, which is one of the important indicators showing decreased apoptosis, decreased, on the contrary, bax, caspase-3, gadd153, grp78, AIF and wee1 levels, which express increased cancer cell death, increased. This study revealed that saffron has a positive effect, especially in the treatment of skin cancer. It has been demonstrated that saffron may exert a synergistic effect with various chemotherapeutics while directing the cancer cell to death.**

Key Words: bax, bcl-2, caspase-2, Saffron, Skin Cancer.

1. GİRİŞ

İnsan sağığına sağıladığı olumlu etkileri sayesinde birçok bitki ve taşıdığı etken maddeler, günümüze kadar birçok araştırmanın konusu olmakla birlikte günümüzde olduğu gibi gelecekte de birçok klinik araştırmanın konusunu oluşturacağı düşünülmektedir¹.

Güncel tıbbi yaklaşımların yanı sıra alternatif tıp ile birlikte koruyucu hekimlik uygulamalarında da tıbbi bitkilerin giderek daha fazla tercih edildiği bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya nüfusunun %80 kadarının tedavi süreçlerinde bitkisel preparatları tercih ettiğini ifade etmektedir².

Günümüzde kanser tedavisinde uygulanan cerrahi yöntemler, kemoterapötik ajanlar ve radyoterapi uygulamaları daima etkili sonuç vermemekte, bunun yanı sıra kanser hücrelerinin de zamanla tedaviye dirençli hale gelmelerine neden olabildiği bilinmektedir². Kanser hastalarının tedavi süreçlerinde tıbbi bitkilerin kullanımının gün geçtikçe arttığı ve modern tedaviye göre daha kolay uygulanabilmesi, yan etkisinin daha az olması ve daha ucuz olması gibi avantajlara sahip olduğu bildirilmiştir³. Kanser hastalarının tedavisinde kullanılması tercih edilen bu tıbbi bitkilerin özellikle içerdikleri antioksidan bileşenlerin yüksek olduğu ve antikanser etkilerinin bununla doğrudan bağlantılı olduğu bilinmektedir⁴.

Günümüze kadar yürütölmüş birçok çalışmada antioksidan enzim aktivitesinin düşük olması ve oksidatif stresin yüksek olması ile kanser hücrelerinin oluşumu arasında doğrudan ilişki olduğu gösterilmiştir ve günlük antioksidan takviyelerinin düzenli alınması sayesinde kanser hücrelerinin oluşum riskini önemli düzeyde azalttığı bildirilmiştir⁵.

Onkoloji hastalarının tedavi sürecinde kullanılan tıbbi bitkilerin kimyasal bileşiminde barındırdığı antitümoral moleküller bulundurmalarına ek olarak bağışıklık sistemini güçlendirerek vücudun enfeksiyonlara karşı daha dirençli olmasını sağlayıp, geleneksel tedavi tekniklerinin yan etkilerini azaltarak ya da önleyerek, fizyolojik ve nutrisyonel destek sağlayarak hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde etkin oldukları düşünülmektedir⁶.

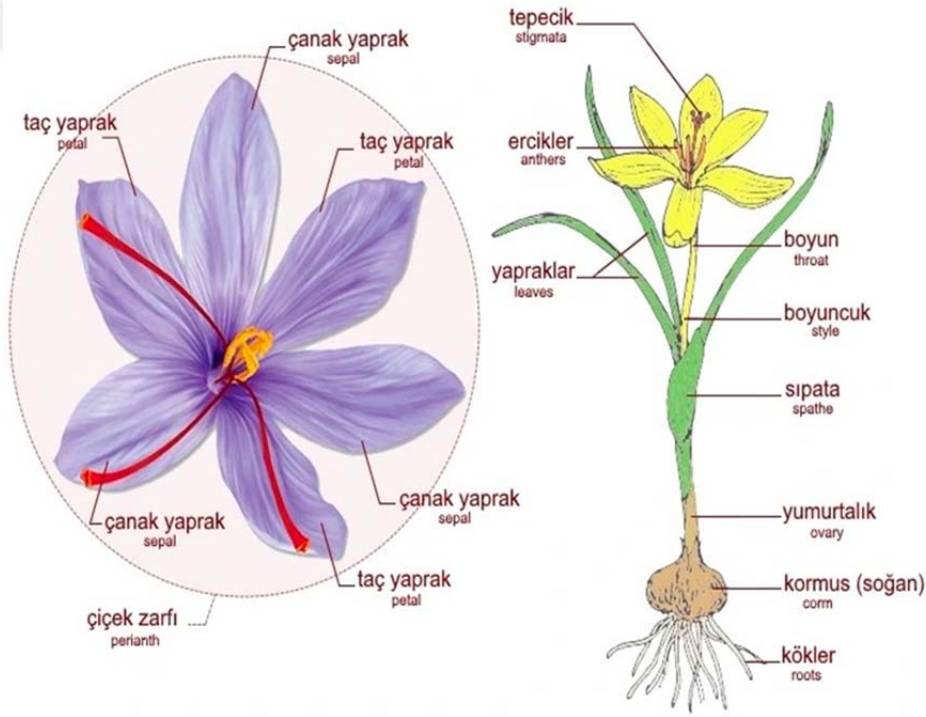
Yaygın olarak safran olarak bilinen *Crocus sativus* L., dünyanın en pahalı baharatlarından birinin hammaddesidir ve yüzyıllardır halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Kimyasal analizler, safran stigmalarında 150'den fazla bileşenin varlığını göstermiştir. Safranın ana bileşenleri krosin, krosetin ve safranaldır. Denekler üzerinde ve hücre kültüründe yapılan çalışmalar, safranın ve ana bileşenlerinin antitümör ve kanser önleyici aktivitelerini göstermiştir, bu aktiviteler için olası mekanizmalar tartışılmıştır. Kemoterapide ve kanseri önlemede koruyucu ajan olarak safranın antikanser etkinliğinin doğrudan kanıtı, birincil olarak kanser insidansında gerçek azalmayı gösteren çalışmalardan gelmektedir⁶.

Bu tez çalışmasında *Crocus sativus* L. (Safran) bitki ekstraktlarının cilt kanseri hücre hattında (ATCC® CRL-6475™ B16-F10) antikarsinojenik etkilerinin ELISA testi kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, safran ile muamele edilmiş cilt kanseri hücrelerinde hücre canlılığı ve apoptoz göstergeleri olan *kaspaz-3*, *bcl-2*, *bax*, *wee1*, *gadd153*, *grp78* ve *AIF* protein düzeyleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

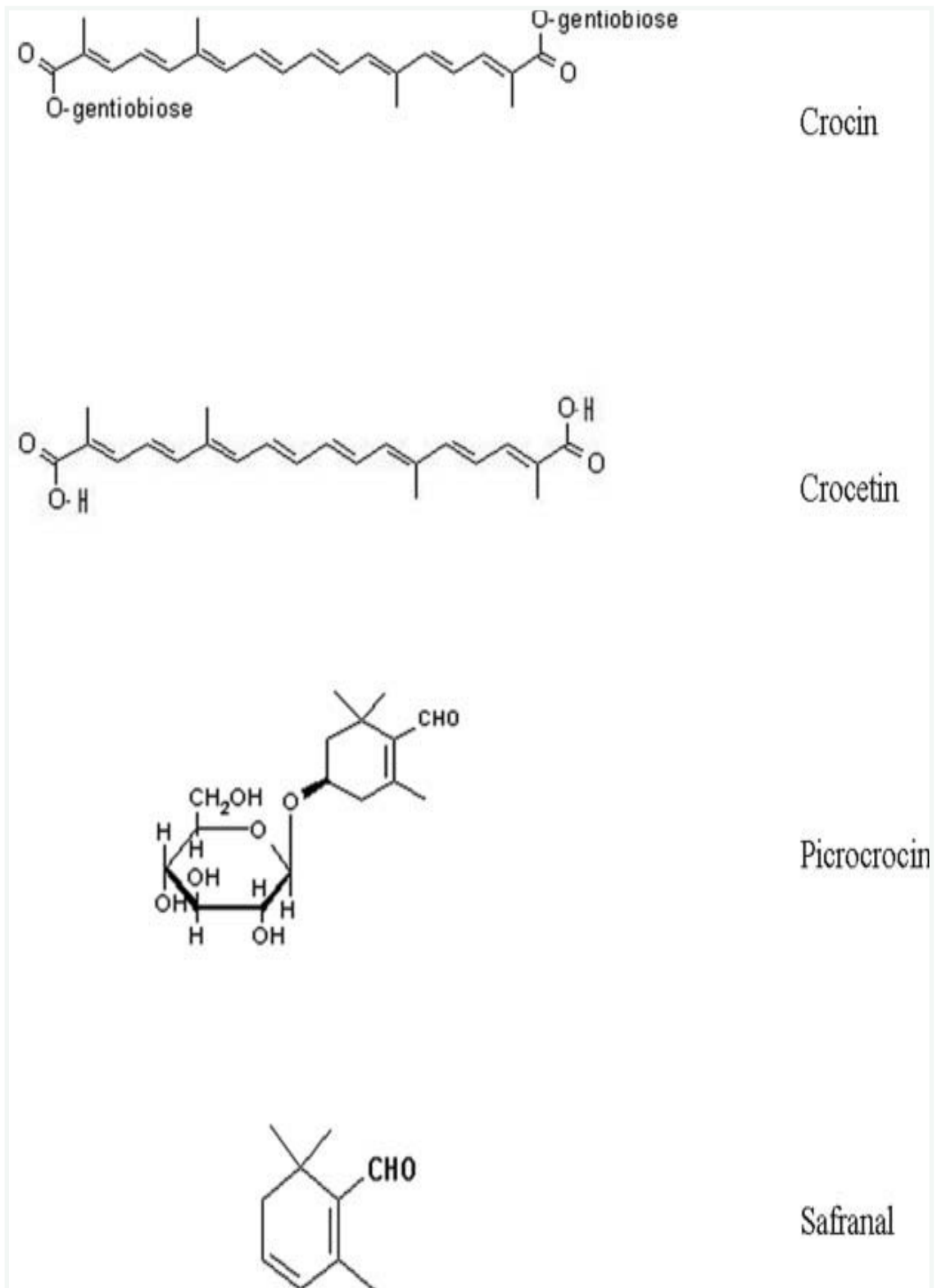
2.1. *Crocus sativus* L. (Safran) Bitkisi ile İlgili Genel Bilgiler

Crocus sativus L. (safran) Akdeniz ve Asya ülkelerinde yetişen Iridaceae (süsengiller) ailesine ait çiğdem cinsinden 20-30 cm boyunda çok yıllık bir kültür bitkisidir⁷. Mavi-mor renge sahip çiçeğinin stilusları ile stigmalarına safran ismi verilmiştir ve baharat olarak da kullanılmaktadır. Safran, eski çağlar itibarı ile antidepresan, dekonjestan, sedatif, analjezik, ekspektoran, spazmolitik, diyaforetik özellikleri ile bitkisel tedavide kullanılmıştır. Tedavi amacı ile kullanımının yanında; gıdalara aroma ve renk vermesi amacıyla ve baharat olarak da kullanılmaktadır⁸.



Şekil 1. *Crocus sativus* L. (safran) bitkisinin morfolojik yapısı⁹

Safran; karotenoid (krosetin, krosin, likopen, α -karoten, β -karoten, zeaksantin vb.), antosiyanin, monoterpen aldehit (pikrokrosin, safranal vb.), flavonoid (naringenin, kemferol, taksifolin), izoforon bileşiklerini içermektedir¹⁰.



Şekil 2. Safran bitkisinin kimyasal bileşimi¹¹

Safran bitkisi özütü ve bileşenleri ile yapılmış olan çalışmalar sonucu antienflamatuar, antioksidan, antigenotoksik, antikarsinojenik, antihiperglisemik, antihipertansif, karaciğer koruyucu, antiiskemik, antidepresan, obezite önleyici, nöroprotektif özellikler taşıdığı gösterilmiştir¹².

Safran, mide bağırsak rahatsızlıklarında ağrı kesici ve sakinleştirici ilaç olarak halk arasında kullanılmaktadır. Bununla beraber kansızlık, iktidarsızlık, gut, kalp çarpıntısı, nefes darlığı gibi hastalıkların tedavisinde de kullanımı yaygındır³.

Hosseinzadeh ve ark. safran özütü ve içeriğinde bulunan krosinin fare deneyinde metil methanosülfat ile DNA hasarı oluşturulmuş bazı organlar (dalak, akciğer, böbrek, karaciğer) üzerindeki etkisini incelemiş ve koruyucu etki gösterdiği sonucuna varmışlardır¹³.

Samarghandian ve ark. akciğer kanseri hücre hattı üzerinde safran ekstraktının antikarsinojen etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucu safranin hücre bölünme ve çoğalma hızını yavaşlatarak ve kaspaz yolağını kullanan apoptozu indükleyerek, antikarsinojen etki yarattığı gösterilmiştir¹⁴.

Premkumar ve ark. yaptıkları çalışma ile safran ekstraktının Swiss albino farelerinde mitomisin-C, sispaltin, siklofosfamid ve ürethan ile indüklenen genotoksisiteye karşı antigenotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir¹⁵.

Nair ve ark. intraperitoneal transplantasyonla sarkom ve lenfoma tümörleri nakledilen edilen farelerde safran ekstraktının antitümöral etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca ekstrakt tümör hücrelerine karşı in vitro ortamda da sitotoksik etki göstermiştir¹⁶.

Malaekheh-Nikouei ve ark. safranalın hücre kültürü çalışmalarında kanser hücre hatlarında antitümör etki gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır¹⁷.

Escribano ve ark. gerçekleştirdikleri hücre kültür çalışmalarında safranal, krosin ve pikrokrosinin HeLa hücre hattında sitotoksik etki gösterdiğini bildirilmişlerdir¹⁸.

Abdullaev, krosetinin kanser hücre hatlarında artan dozlarda protein ve nükleik asit sentezini durdurduğunu göstermiştir¹⁹.

Magesh ve ark. İsveç albino farelerinde oluşturulan akciğer kanserine karşı krosetinin, glutatyon ve ksenobiyotik enzimler üzerindeki etkisini araştırmış, koruyucu etki gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır²⁰.

Abdullaev ve ark. safran özütünün farklı malign insan hücre hatları üzerindeki etkilerini in vitro ortamda incelemiştir. Ekstraktın normal hücrelere etki etmezken, malign hücrelere artan doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ifade etmişlerdir²¹.

Buna ek olarak safranın farklı bileşenlerinin HeLa hücre hattı üzerinde etkileri incelenmiştir, içeriğindeki karotenoidlerin tümör hücrelerinin çoğalmasını önlediği görülmüştür²¹.

Tanaka ve ark. dekstran sodyum sülfat ve azoksimetan verilerek kolorektal lezyon yaratılan farelerde, krosin uygulaması ile enflamasyon ve tümör oluşum oranının önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir²².

Das ve ark. safranın melanoma üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada ekstraktın, kanserin 2. evresindeki farelerde prognozu azaltıcı etki gösterdiğini bildirmişlerdir²³.

Ayrıca bu çalışmada yapılan biyokimyasal analizlerde bitki ekstraktının uygulamasına bağlı olarak glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi detoksifikasyon enzimlerinin etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Tümör oluşum hızının azalması söz konusu enzimlerin aktivitesinin artmasıyla lipid peroksidasyon hızının azalması ile ilişkilendirilmiştir²³.

Assimopoulou ve ark. safran ekstraktı ile safranal ve krosin bileşenlerinin belirgin derecede antioksidan aktivite gösterdiklerini ifade etmişlerdir²⁴.

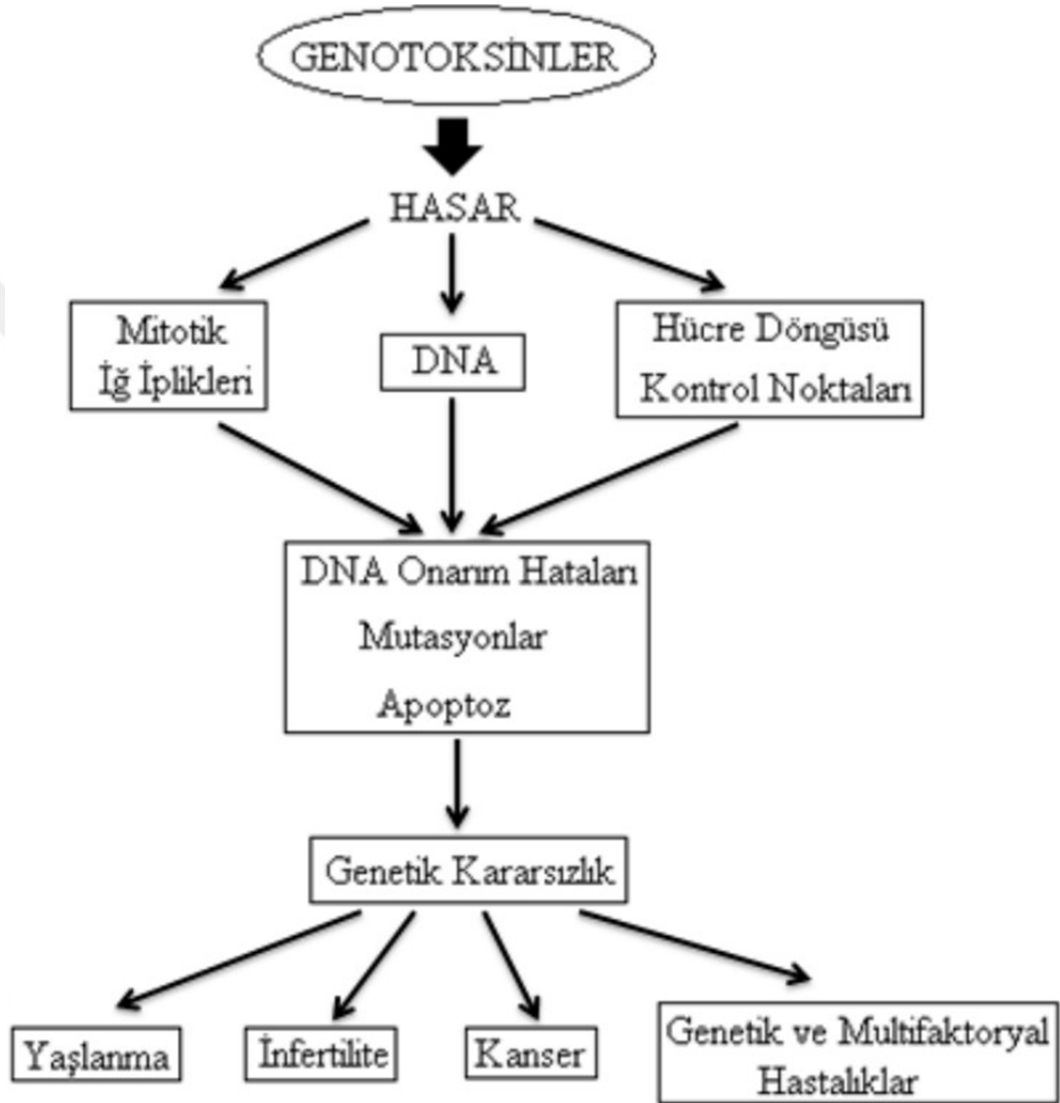
Hosseinzadeh ve ark. safran ekstraktı ile aktif bileşeni krosinin, iskemi ve reperfüzyon hasarı sonucu görülen oksidatif stresi önlemede etkin olabileceğini raflarda yaptıkları çalışmalar sonucu bildirmişlerdir²⁵.

Karimi ve ark. çeşitli çözücüler kullanarak elde ettikleri safran ekstraktlarının içeriğindeki flavonoidlerin ve fenolik bileşenlerin etkilerini incelemişler, antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir²⁶.

2.2. Genotoksisite ve Kanser Gelişimi

Genotoksisite terimi, kromozom ve genlerin sayısında ve yapısında toksik maddelerin de etkisiyle oluşan değişiklikleri ifade etmektedir. Organizma iç etken olarak reaktif oksijen türleri ve alkilleyici ajanlara ve bunun yanı sıra dış etken olarak da viral, kimyasal ve fiziksel unsurlara maruz kalabilmektedir. Bu maruziyetler, sayısal ve yapısal olarak, genlerde ya da kromozomlarda değişikliklere sebebiyet vermektedir.

Genotoksik maddeler doğrudan kromozom ve gene etki edebilecekleri gibi DNA ve hücre bölünmeleri, DNA tamiri ve hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan enzimlerin ve proteinlerin yapısında değişikliğe neden olarak dolaylı yollarla da genotoksisiteye neden olabilmektedir²⁷.



Şekil 3. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları²⁸

İnsanlar günlük hayatta besinler, radyasyon, UV, kimyasallar ve benzeri yollarla genotoksik etmenlere maruz kalabilmektedirler. İnsan vücudu genetik materyalde görülen mutasyonları tamir etmek için çeşitli mekanizmalara sahiptir, fakat bu mekanizmalarda aksamalar olabilmekte, mutasyonlar tamamı ile tamir edilemeyebilmektedir²⁹.

Genetik materyalde mutasyonların birikimi sonucu kanser gelişebilmektedir. Bu nedenle organizmada genotoksik etkiye neden olan bir madde kanserojen etkiye de neden olabilmektedir²⁹.

Birçok faktörün etkisi ile ortaya çıkan karsinojenitenin meydana gelmesinde reaktif oksijen türleri (ROS)'un önemli bir etkisinin olduğu bilinmektedir. ROS; serbest ve serbest olmayan radikaller olarak iki grup altında toplanmaktadır. Oksijenli solunum yapan canlılarda gerçekleşen normal metabolik olayların sonucunda oluşmalarının yanı sıra organizmanın sitokin, ksenobiyotik ve bakteriyal invazyona maruz kalması ile meydana gelen bileşiklerdir²⁹. ROS, düşük miktarlarda yararlı ve gerekli iken, yüksek miktarda canlı için tehlike oluşturmaktadırlar³⁰.

Hücre içinde bulunan ROS'un, enfeksiyon ajanlarına karşı oluşan hücresel cevapta, hücre sinyal mekanizmalarının düzenlenmesinde, hücre fonksiyonlarının yerine getirilmesinde, fizyolojik ve biyosentetik süreçlerde önemli rolü olduğu bilinmektedir³¹.

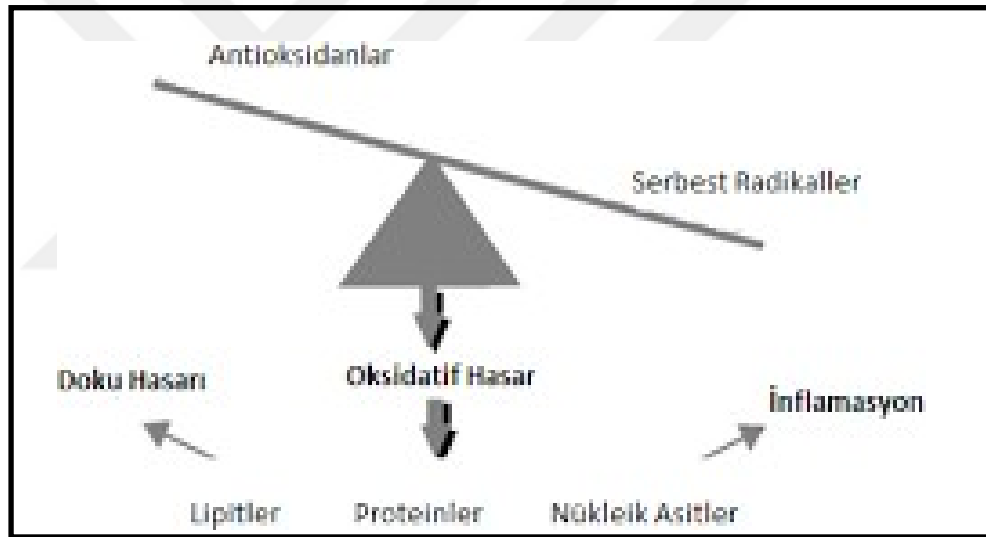
Çizelge 1. Reaktif Oksijen Türleri

Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Hidrojenperksit	H_2O_2
Hidroksi	$OH^{\bullet}$	Hipoklorikasit	$HOCl$
Peroksi	$ROO^{\bullet}$	Hipobromikasit	$HOBr$
Alkoksi	$RO^{\bullet}$	Ozon	O_3
Hidroperoksi	$HOO^{\bullet}$	Singlet oksijen	ΔO_2

Kanser hücrelerinde metabolizma hızı normal hücrelere kıyasla daha yüksektir. Bu durum beraberinde daha fazla miktarda ROS üretimini de getirmektedir. Buna bağlı olarak, malign hücrelerde yüksek oranda oluşan ROS'un hücreye zarar vermesinin önlenmesi, yüksek antioksidan aktivite ile sağlanır³². Antioksidan aktivitenin artması sonucu ROS seviyesi hücrenin ihtiyacının olduğu düzeye kadar azaltılabilir de kanser hücresinde üretimi devam eden ROS'un etkisi ile genotoksisite devam edebilir ve karsinojenite meydana gelebilir³³.

ROS hücre içerisinde birçok enzim (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz vb.) veya enzimatik olmayan (tiyoller, glutatyon, flavonoidler, karotenoidler vb.) yollar aracılığı ile antioksidanlar aracılığı ile parçalanır, böylece ROS'un vücut için zararlı etkilerinin önüne geçilir³³. Vücutta bulunan ROS miktarının artması ya da antioksidan miktarının azalması, başka bir deyiş ile antioksidan maddeler ve ROS arasındaki dengenin bozulması vücutta oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır³².

Oksidatif stres, canlı yapısında bulunan DNA, RNA, lipid, protein ve benzeri moleküllerin işlevlerinde ve yapılarında bozulmaya neden olmaktadır³⁴. Makromoleküllerin işlevi ve yapılarında meydana gelen bozukluklar ise diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalıkların ve arterosklerozun ortaya çıkması ile sonuçlanabilmektedir ve yaşlanmanın da önemli bir etkeni olarak ifade edilmektedir³⁵.

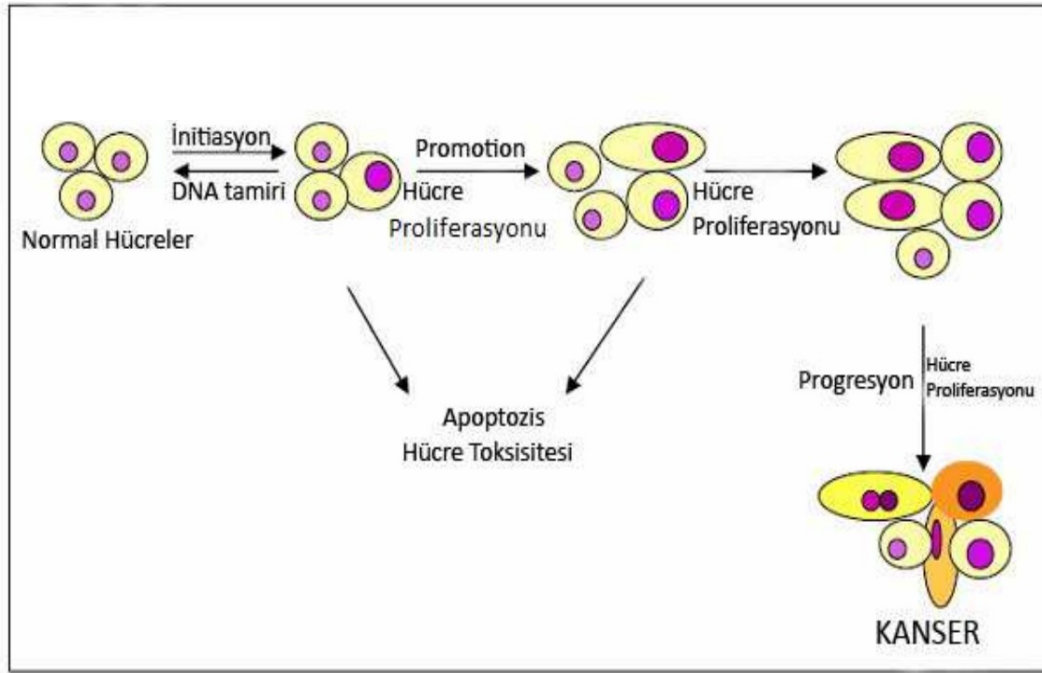


Şekil 4. Oksidatif hasar ve sonuçları³⁶

2.2.1. Kanser

Kanser, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasına neden olan, yayılım gösterebilen hücrelerin gelişimine neden olan, gen ekspresyonu değişiklikleri içeren anormal hücre çoğalmasıdır³⁷. Kanser gelişimi karsinogenez olarak da adlandırılan çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç, inisiyasyon, promosyon ve progresyon olarak adlandırılan üç aşamadan oluşmaktadır.

- İnisiyasyon; karsinojenlerle uyarılma ile hücrelerde genetik değişiklik sonucu tümörleşmenin başlaması,
- Promosyon; yapısal değişikliğe uğrayan hücrelerde bölünme hızının artması sonucu tümörün ilerlemesi,
- Progresyon ise; kontrolsüz çoğalan hücrelerin invazyon ve metastaza sebep olmasıdır³⁸.



Şekil 5. Karsinojenez aşamaları³⁹

Kanserler büyüme oranlarına, başlangıç yaşlarına, tedaviye verdikleri tepkilere, yayılımlarına ve evrelerine göre çeşitlilik göstermelerine karşın bazı ortak özelliklere sahiptir⁴⁰. Ortak temel özellikleri; genetik kararsızlık, kontrolsüz hücre çoğalması, immortalite, hücreler arası zayıf bağ, metastaz, kontak inhibisyon kaybı ve hatalı hücre tutunmasıdır³⁸.

Cilt, vücudun dış tabakasını oluşturmaktadır. Geniş yüzeye sahip olması, dış kanserojenlere direkt olarak maruz kalan ciltte kanser oluşumu, oldukça sık görülen bir durumdur⁴¹.

2.2.2. Cilt Kanseri

Cilde rengini veren melanin pigmenti, melanosit adı verilen cilt hücreleri tarafından sentezlenir. Bu hücrelerin kontrolsüz çoğalması cilt kanserini beraberinde getirmektedir. Melanom veya melanoma olarak tanımlanan bu kanser türü diğer kanser türlerinde olduğu gibi sağlıklı genlerde meydana gelen mutasyonlar ya da kontrolsüz çoğalmayı durduran genlerin fonksiyonlarında oluşan bozulmalara bağlı olarak görülmektedir. Malign melanoma %10 oranında kalıtsal geçiş göstermektedir. Bu nedenle hastalığın gelişmesinde genetik yatkınlık oldukça önemlidir^{42,43}.

Cilt (deri) kanserinin dünyada ve ülkemizde görülme sıklığı giderek artmaktadır. Cilt kanserinin etiolojisinde en önemli etmen ultraviyole ışınlarıdır. Son yıllarda ozon tabakasında meydana gelen incelmeyle ultraviyole ışınlarına daha fazla oranda maruz kalınmaktadır. Bu durum cilt kanseri gelişimi açısından önemli bir risk faktörüdür^{42,44}. Yaşam boyunca ortaya çıkma sıklığının erkeklerde 33 kişide bir, kadınlarda 52 kişide bir olduğu istatistiksel olarak ifade edilmiştir⁴⁵.

Cilt kanserinin mortalite oranı düşüktür. Fakat estetik bozukluklar ve fonksiyon bozuklukları gibi morbidite oranı yüksek ve tedavileri pahalıdır^{46, 47}. Bununla beraber hastalar, aileleri ve toplum üzerinde maddi, sosyal ve psikolojik yönü kapsayan çok boyutlu bir kavramdır^{48,49}.

Herkesin cilt kanserine yakalanma riski vardır. Buna karşın çok sayıda ben ve lekeleri olan, açık tenli ve uzun süre güneşe maruz kalan, erken çocukluk döneminde güneş yanığı hikayesi olan bireylerin cilt kanserine yakalanma olasılığı daha fazladır⁵⁰.

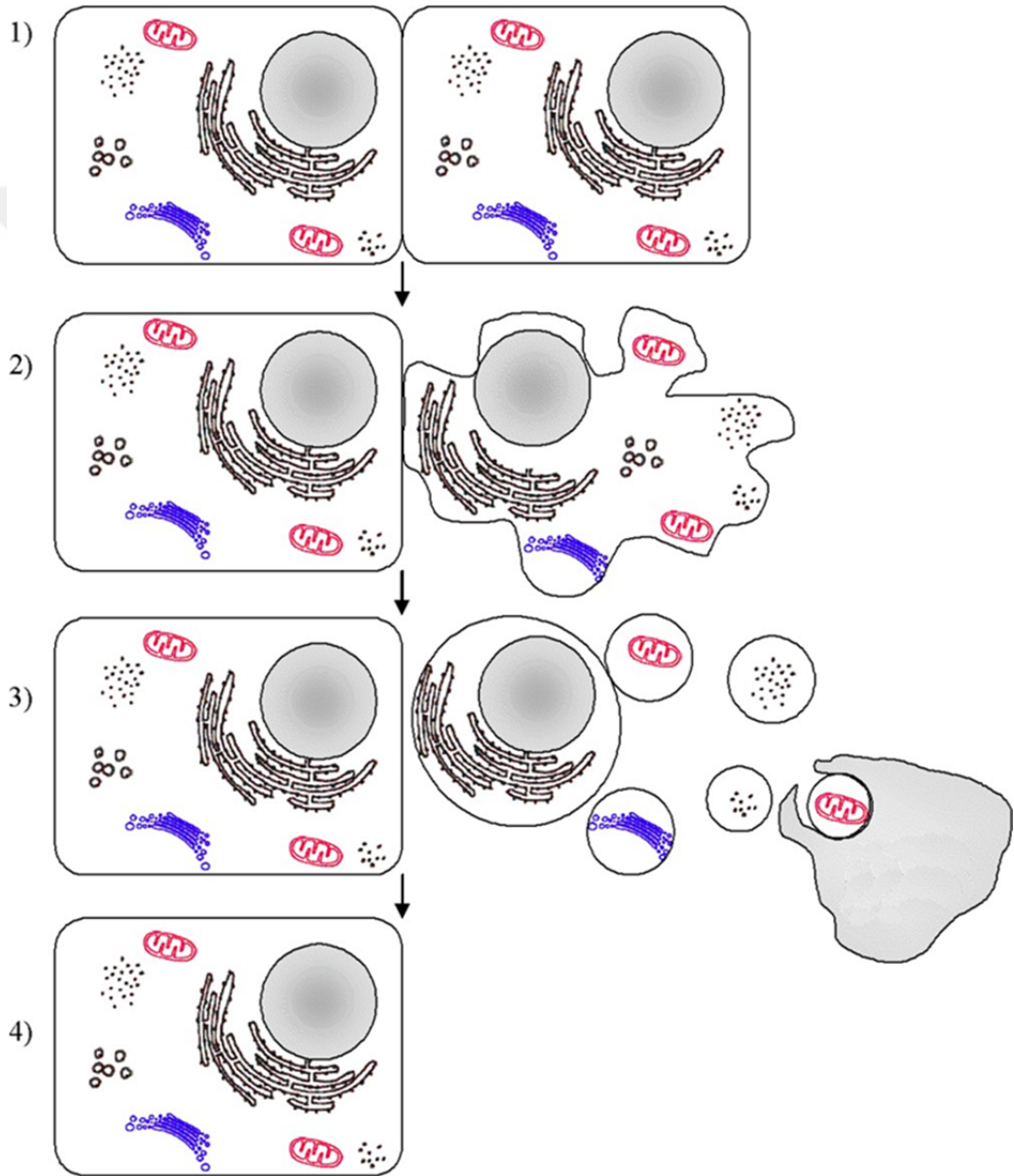
Çocuklukta melanin üretimi kısıtlıdır. Bu nedenle çocukluk döneminde bireyler, güneş ışınlarına ve yol açtığı zararlı etkilere karşı duyarlıdırlar. Bununla birlikte ömür boyu güneş ışını maruziyetinin yaklaşık %80'i 18 yaşından önce olmaktadır⁵¹.

2.3. Apoptoz

Apoptoz, Yunanca kökenli bir kavram olup, apo (ayrı) ve ptosiz (düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Hücre intiharı, hücre ölümü ve hücre kaybı olarak da tanımlanmaktadır. İşlevi, dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasıdır. Organizmaya zarar verebilecek hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar ve bir tür savunma mekanizması oluşturmaktadır⁵².

DNA hasarının meydana gelmesi durumunda, ilgili hücre apoptoz ile ortadan kaldırılmaktadır. DNA yapısında mutasyon bulunan hücrelerin, kanserleşme olasılığı da ortadan kaldırılmış olmaktadır.

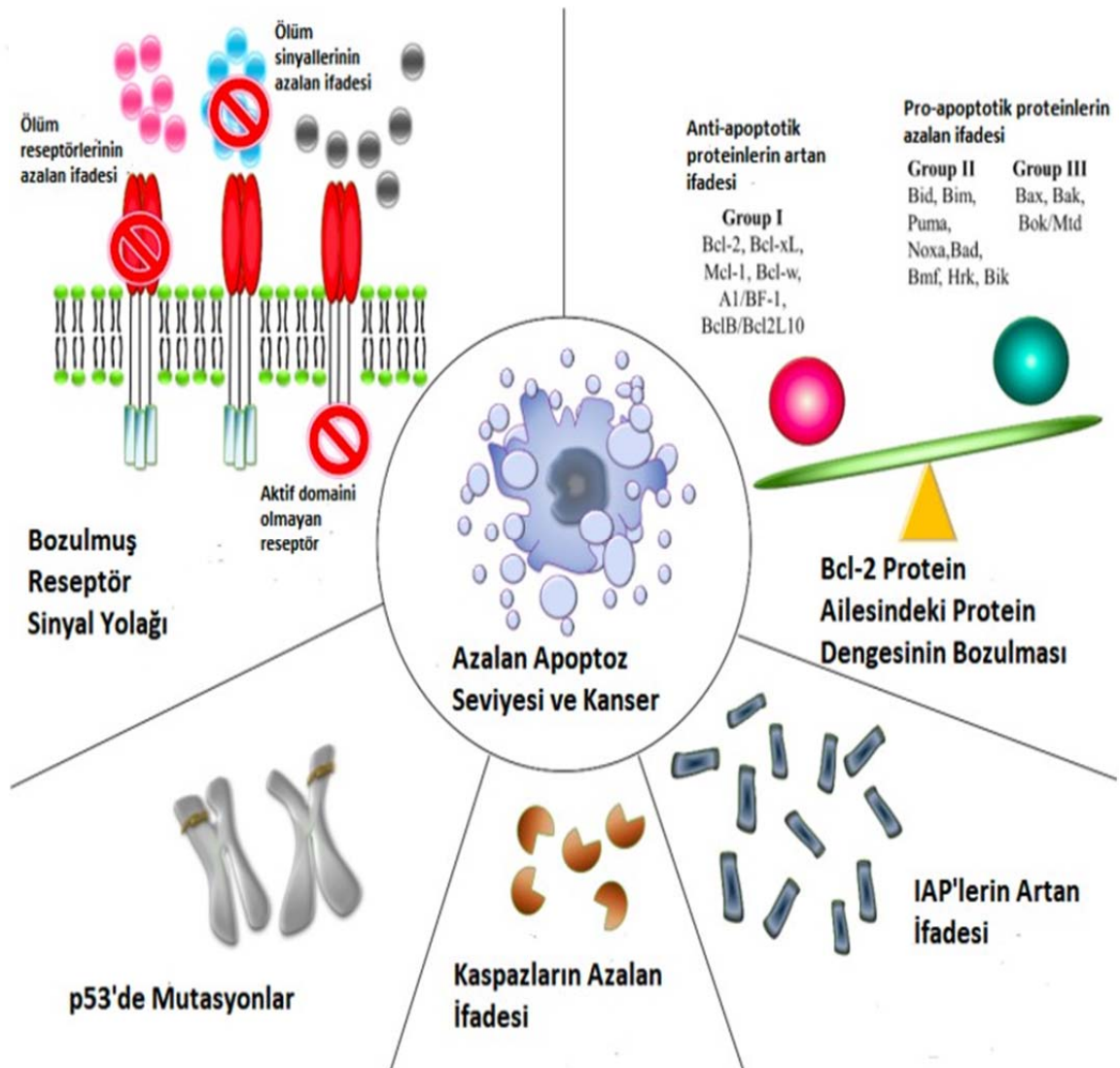
Programlanmış hücre ölümü; embriyolojik gelişimde ve yetişkinlerin dokularında çok önemli bir rol oynayan hücre ölümünün normal fizyolojik bir biçimidir⁵³.



Şekil 6. Apoptozun evreleri⁵⁴

Apoptozis için sinyal alan bir hücrenin kromatini ve benzer bir şekilde sitoplazması da yoğunlaşır. Hücrenin boyutları giderek küçülmeye başlar. Belirli bir süre sonra, apoptotik cisimcik olarak isimlendirilen küçük parçalara bölünen hücrelerin yüzeyinde yeni sinyal verici yapılar belirir ve bu sinyalin uyarısı ile yakınlardaki hücreler (genellikle histiyositler) tarafından fagosite edilir ve ortadan kaldırılır^{55,56}.

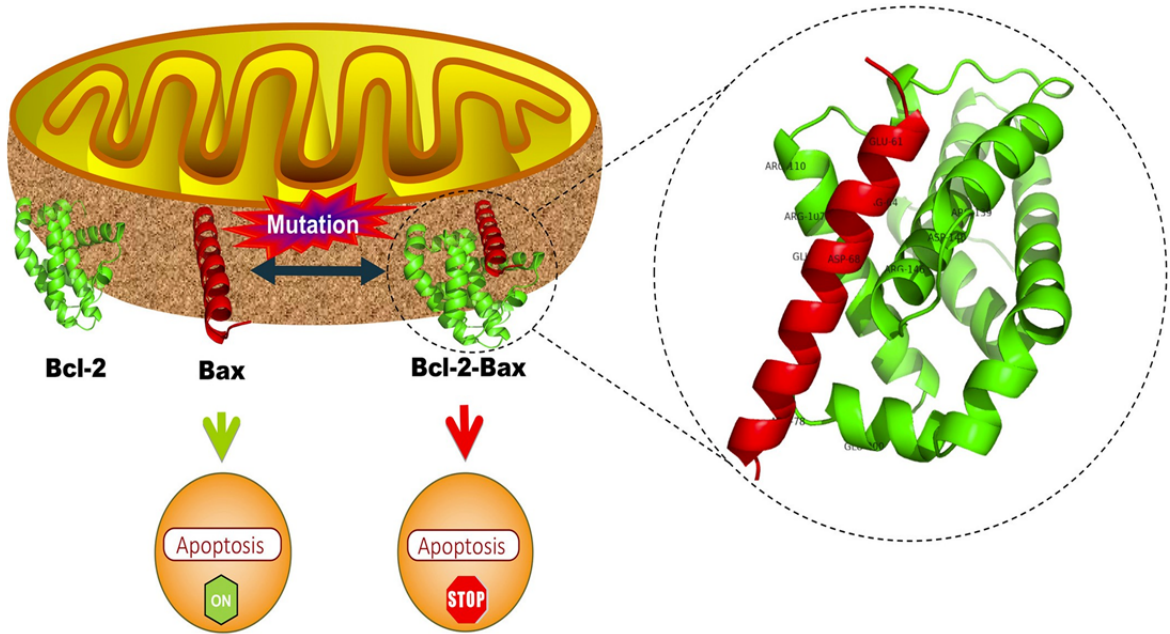
Apoptozis birçok aracı molekül tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı organeller (mitokondri), iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), proteinler (p53) ve hatta genler (c-myc) bulunmaktadır⁵⁷.



Şekil 7. Azalan apoptoz seviyesi ve kanser ilişkisi⁵⁸

2.3.1. Bcl-2/Bax Gen Ailesi

Apoptozun düzenlenmesi çoğunlukla Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanmaktadır. Bu gen ailesinin yaklaşık 20 üyesi vardır; bazıları apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanmaktadır. Hücrenin hayatta kalma durumu bu gen ailesinin antiapoptotik ve proapoptotik üyelerinin oranına bağlıdır. Bcl-2/Bax ailesinin üyeleri, çekirdek ve mitokondri zarlarının yanında; endoplazmik retikulum zarında da yer alırlar. Anti ve pro-apoptotik Bcl-2 gen ailesi üyelerin dengesi, ölüm ile yaşam arasındaki seçeneği belirlemektedir⁵⁹.

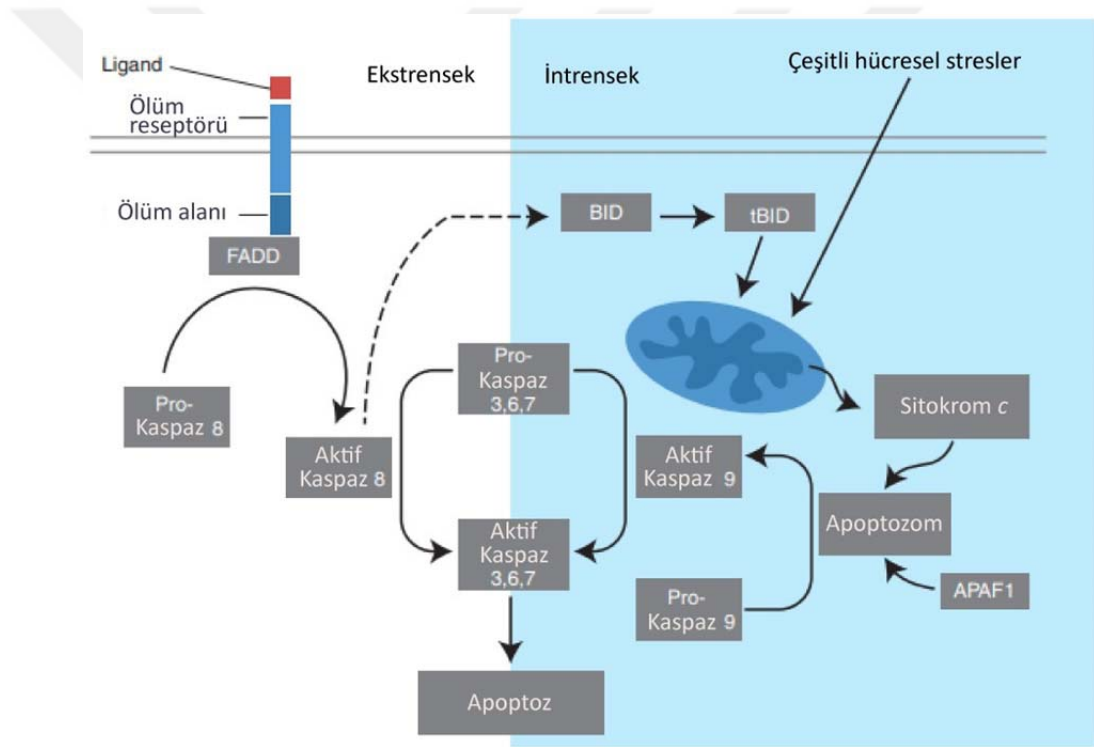


Şekil 8. Bcl-2 ve Bax gen ailesinin apoptozdaki rolü⁶⁰

Bcl-2 proteini, endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında ve mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde yerleşmiştir. Bax proteinleri ise sitoplazmada da bulunmaktadır. Apoptoz sinyalinin alınması ile, Bax proteinleri mitokondri zarının porlarına doğru yönlendirilir ve buraya tutunurlar. Bu bağlanma sonucu seçici iyon geçirgenliği azalmaktadır. Zardaki bu değişiklikler ile AIF (Apoptosis Inducing Factor) ve sitokrom c gibi mitokondri zarında yer alan faktörler sitoplazmaya geçmekte ve hücre ölümü gerçekleşmektedir⁶¹.

2.3.2. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptozda rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Açılımı "Cysteine Aspartate Specific Proteases - CASPASE" şeklindedir. Memelilerde en az 14 çeşit kaspaz bulunmaktadır. Kaspaz-3; kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşime giren bir kaspaz proteindir. CASP3 geni tarafından kodlanmaktadır. İlk sentezlendiklerinde inaktif formdadırlar. İnaktif form olan prokaspaz, apoptozun uyarılması sonucu aktif kaspaz formuna dönüşür. Hücre ölümü sırasında gerçekleşen pek çok hücreyel ve şekilsel değişim, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler sonucu meydana gelmektedir^{62,63}.

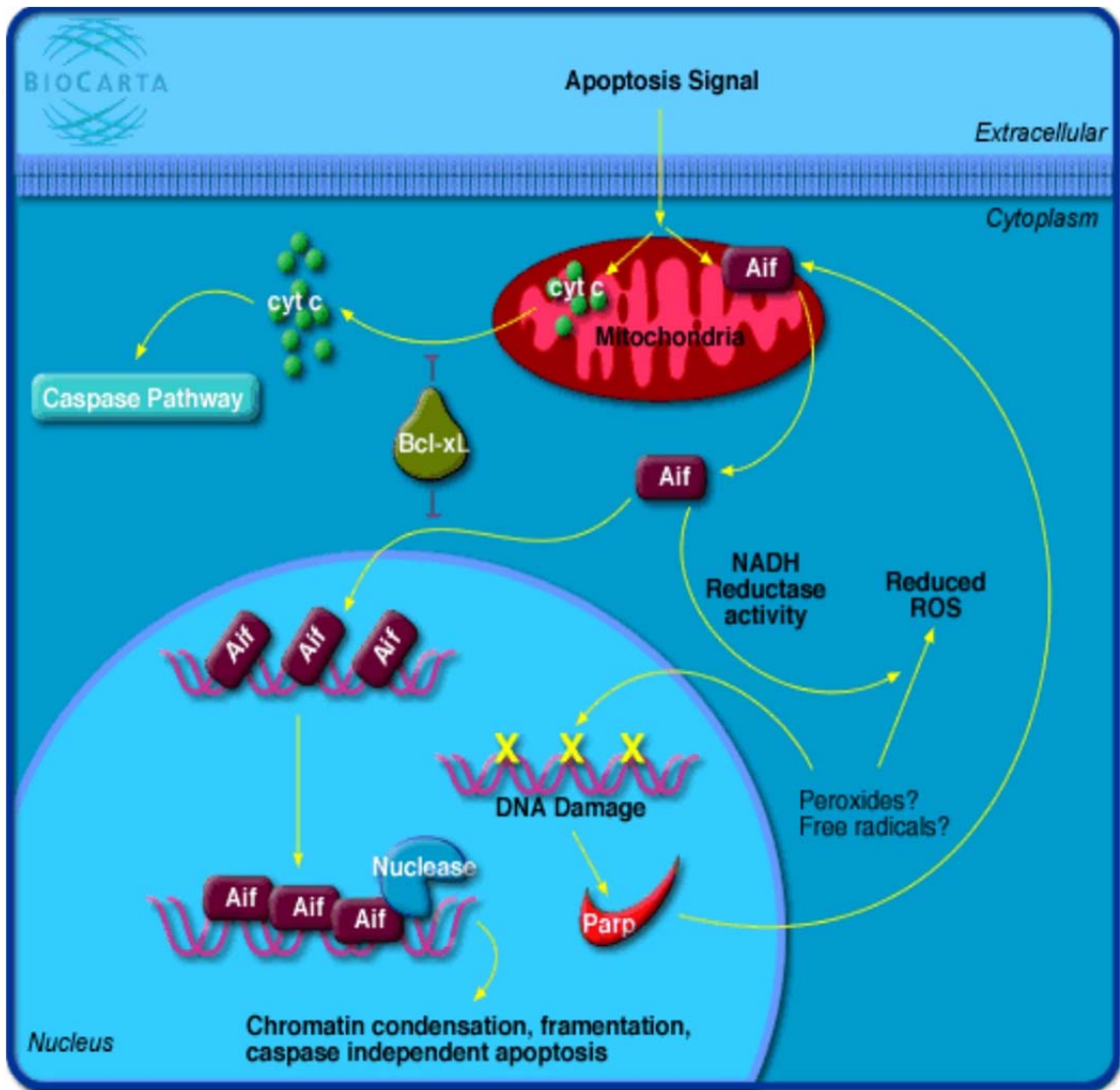


Şekil 9. Kaspaz yolu ile apoptoz⁶⁴

Normal şartlarda apoptozu tetikleyici bir molekül olan Apaf-1, Bcl2 ile bağlı durumda bulunur ve apoptoz baskılanmış durumdadır. Hücre içi faktörlerin uyarılması sonucu, Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive etmekte ve oluşan bu kompleks apoptozom olarak isimlendirilmektedir. Prokaspaz-9'un uyarılması, bir seri kaspaz aktivasyonunu ve dolaylı yoldan hücre ölümünü başlatmaktadır⁶⁵.

2.3.3. Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF) Yolağı

Aşırı stres koşullarında bulunan hücrelerde, kaspaz bağımlı diğer mekanizmalardan farklı olarak alternatif bir yol olan AIF yolu ile apoptoz gerçekleşmektedir. AIF proteini normal koşullarda mitokondrinin iki zarı arasındaki ara bölgede yer almaktadır. Hücrenin apoptoz olması gerektiğini belirten bir sinyal aldığında, sitokrom-c ile birleşerek mitokondriden dışarı çıkarmaktadır. Çekirdekte DNA'ya bağlanır ve nükleaz aktivitesine yol açarak DNA fragmentasyonunu uyarır^{66,67}.



Şekil 10. AIF yolağı ile apoptoz⁶⁸

2.3.4. GRP78 ve GADD153 Proteinleri

Endoplazmik retikulum (ER) hücre içinde homeostazı sağlamaktadır. ER stresinin, hücrelerin kendini koruma mekanizması olduğu kanıtlanmıştır; Bununla birlikte, aşırı güçlü veya uzun süreli ER stresi hücre apoptozisine, yani ER stresi aracılı hücre ölümüne yol açmaktadır. ER stresine, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikmesiyle sonuçlanan bir dizi biyokimyasal ve fizyolojik uyaran neden olmaktadır⁵³.

Son zamanlarda, ER stresi aracılı apoptoz yolunun, nörodejeneratif bozuklukların patofizyolojisinde çok önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır.

Glikoz düzenlenmiş protein 78 (GRP78) ve büyüme durdurma DNA hasarı indüklenbilir gen 153 (GADD153), ER stresinin iki anahtar belirteçlerdir. ER stresi sırasında iki farklı mekanizmayı temsil ederler.

GRP78, açılmayan protein reaksiyonunda ve ER stresi sırasında koruma mekanizmasında yer alır; GADD153, aşırı ER stresinin neden olduğu yaralanma mekanizmasında rol oynar. İki protein düzeyinin yükselmesi, ER stresinin bir göstergesidir⁵⁶.

2.3.5. Wee 1 Proteini

Atipik tirozin kinaz Wee1, hem sağlıklı hem de tümörijenik hücrelerde DNA sentezinde ve mitotik kontrol noktalarında hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Hücre boyutunun düzenlenmesi, bir hücrenin işlevselliğini sağlamak için kritik öneme sahiptir⁶⁶.

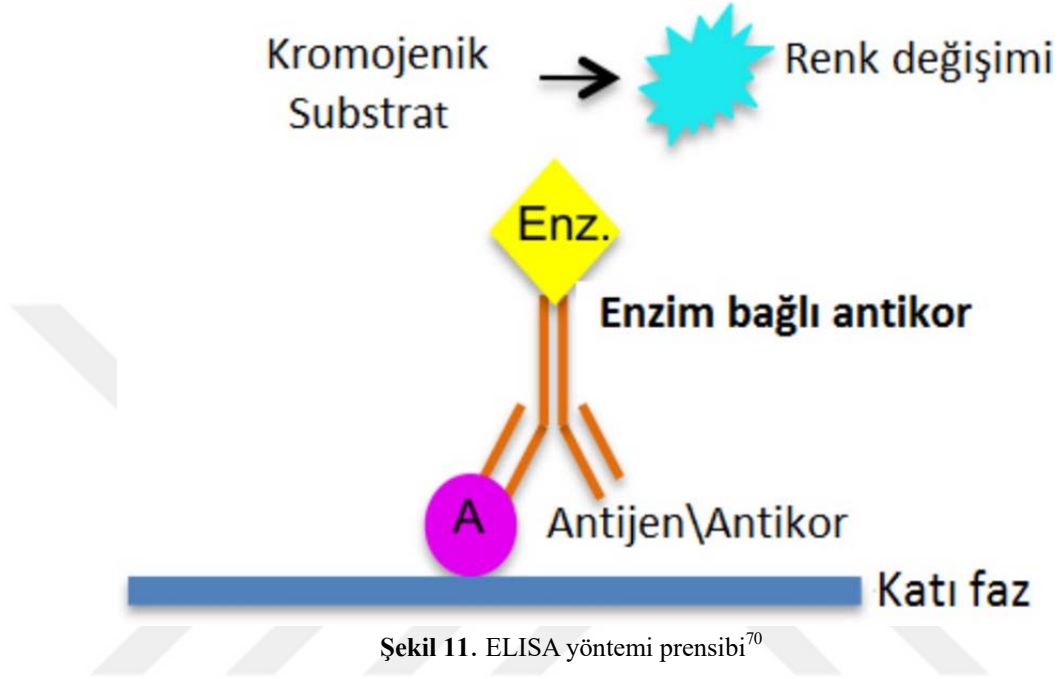
Wee1 bu kontrol noktasının bir bileşenidir. Bölünen hücrenin mitoz giriş zamanını belirleyen ve böylece meydana gelecek yavru hücrelerin büyüklüğünü etkileyen bir kinazdır⁶².

Wee1 fonksiyonunun kaybında, hücre bölünmesi daha erken meydana gelir ve normalden daha küçük boyutta yavru hücreler oluşur⁶².

2.4. ELISA Yöntemi

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Enzime bağlı bağışıklık deneyi) testi, apoptozun belirlenmesinde ve bakteriyel, viral ve parazit enfeksiyonların tanısında faydalanan, serolojik tanı metotlarından biridir. ELISA yönteminde, öncelikle antijen-antikor kompleksine enzimle işaretli bir antiglobulinin ilave edilmektedir.

Daha sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Spesifik, duyarlı ve çabuk sonuç veren bir testtir⁶⁹.



Apoptozda meydana gelen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların geçişi ve DNA bölünmesidir⁷¹.

ELISA testi ile kültürü yapılmış hücre populasyonlarında ve aynı zamanda da insan plazmasında DNA fragmentasyonunun tespit edilmesi mümkündür. ELISA testinde, pleytlerdeki sitoplazmik nükleozomları belirlemek ve yakalamak için iki nükleozomal epitopa spesifik bir çift monoklonal antikor kullanılır. Bu analiz yöntemi agaroz jel elektroforez ile apoptozun belirlenmesinden yaklaşık 500 kat fazla duyarlı ve çok sayıda örneğin test edilmesi açısından daha uygun bir yöntemdir⁷².

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Safran Bitki Ekstraktının Hazırlanması

ELISA ve hücre kültürü uygulamalarında safrandan elde edilen kaba ekstraktlar kullanılmıştır. Ekstraktların hazırlanmasında çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Safran porselen havanda toz haline gelinceye kadar ezildikten sonra öğütülen bitki materyalleri %80 etanol ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım daha sonra 5 gün boyunca 4°C'de maserasyona tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon filtre edildikten sonra düşük basınç altında döner bir buharlaştırıcıda 40°C'de kurutularak su ve etanol uzaklaştırılmıştır.

3.2. Hücre kültürü

Cilt kanseri hücreleri (B16F10), %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), %1 L-Glutamine (Hyclone) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Hyclone) içeren Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) (GIBCO) besiyerinde inkübe edilmişlerdir. Hücreler 24'lük standart hücre kültürü platelerinde 1×10^5 sayısında tek tabaka halinde yetiştirilmişlerdir. 37°C sıcaklıkta ve % 5'lik CO₂'li etüvde inkübe edilmişlerdir. Bu hücreler 12, 24, 48 ve 96 saat safran (%99,2 kültür ortamı ve %0.8 safran) ile muamele edilip ELISA yöntemiyle protein analizleri için homojenize edilmişlerdir.

3.2.1. MTT Testi

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) testi mitokondriyal aktiviteyi ölçmek için kullanılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara (3x10³ hücre/ml) ekilmiş ve 48 saatlik farklı konsantrasyonlardaki safran maruziyetinin (1 µl, 2 µl, 3 µl ve 4 µl miktarlarında) ardından hücre kültür medyumuna atılmıştır. Hücreler 100 µl MTT çözeltisi ile (0,5 mg/ml miktarında DMEM içinde çözdürülmüş) 2 saat 37°C'de ve %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. MTT çözeltisi daha sonra atılmış ve her bir kuyucuğa 100 µl Dimetil sülfoksit eklenmiştir.

Optik yoğunluk (OD), 550 nm'de bir mikropilaka okuyucuda (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc.) okunmuştur. Canlılık, her bir durum için elde edilen OD ortalamasının, kontrol (safran içermeyen) koşuluna oranı olarak hesaplanmıştır.

3.2.2. Doku homojenizasyonu

Hücrelerin üzerine gram başına 3 ml RIPA (Radyoimmünopresipitasyon deney) tamponu, 30 µl PMSF (fenilmetilsülfonil florür), 30 µl sodyum vanadat, ve 30 µl proteaz inhibitörü eklenmiştir ve ultrasonik parçalama cihazıyla buz üzerinde dokular parçalanarak homojenatlar elde edilmiştir. Homojenatlar 10.000 RPM’de 10 dakika santrifüj edilip üstte ayrılan kısımlar (süpernatantlar) alınıp, alttaki çökeltiler (pelletler) atılmıştır.

3.2.3. Protein Miktar Tayini

Homojenize edilmiş hücrelerin protein miktar tayini Bradford yöntemi ile yapılmıştır. Sığır serum albumini (1µg/ml) kullanılarak 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10 (µg/ml) konsantrasyonlarda standart hazırlanıp her bir örnekten 10 µl alınarak distile su ile 100 µl’ye tamamlanmıştır. Standart ve örneklerin üzerine 1 ml Bradford solüsyonu eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 595 nanometre dalga boyunda absorbans miktarları manuel olarak ölçülmüştür. Prism programında çizilen standart eğriye göre protein miktar tayini µg/µl cinsinden hesaplanmıştır. Protein miktar tayini ELISA deneylerinin standardizasyonu için yapılmıştır.

3.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Testi

Kaspaz-3, bax, bcl-2, AIF, weel, GADD153 VE GRP78 protein düzeyleri ELISA testi ile incelenmiştir.

3.3.1. Kaspaz-3 Protein Miktar Tayini

Homojenatlardan 100’er µl eliza kuyucuklarına eklenmiştir. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp, yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm’de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek kaspaz-3 enziminin miktarları tayin edilmiştir.

3.3.2. Bax protein miktar tayini

Homojenatlardan 100'er µl eliza kuyucuklarına eklenmiştir. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra

50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm'de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek bax enziminin miktarları tayin edilmiştir.

3.3.3. Bcl-2 protein Miktar Tayini

Homojenatlardan 100'er µl eliza kuyucuklarına eklenmiştir. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm'de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek Bcl-2 enziminin miktarları tayin edilmiştir.

3.3.4. Wee 1 Miktar Tayini

Homojenatlardan 100'er µl eliza kuyucuklarına eklenmiştir. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm’de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek weel enziminin miktarları tayin edilmiştir.

3.3.5. AIF Protein Miktar Tayini

Homojenatlardan 100’er µl eliza kuyucuklarına eklenmiştir. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm’de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek AIF protein miktarları tayin edilmiştir.

3.3.6. GADD153 Miktar Tayini

Homojenatlardan 100’er µl eliza kuyucuklarına eklenmiştir. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra

50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm’de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek GADD153 miktarları tayin edilmiştir.

3.3.7. GRP78 Miktar Tayini

Homojenatlardan 100'er µl eliza kuyucuklarına eklenmiştir. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp, yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra

50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm'de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek GRP78 miktarları tayin edilmiştir.

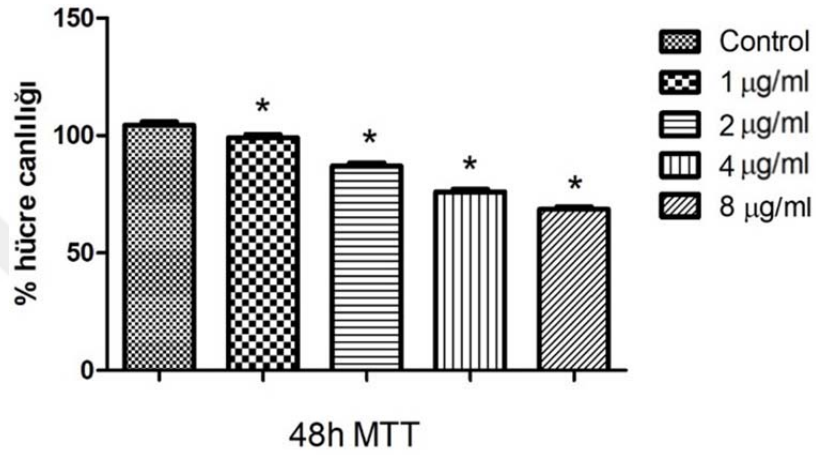
3.4. İstatistiksel Analiz

Protein miktarlarının gruplar arasında istatistiksel önemini belirlemek için Student's t-testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS yazılım paketi ile yapılmıştır. Tüm değerler ortalama $\pm$ SE olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkların $p < 0,05$ seviyesinde istatistiksel yönden anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları

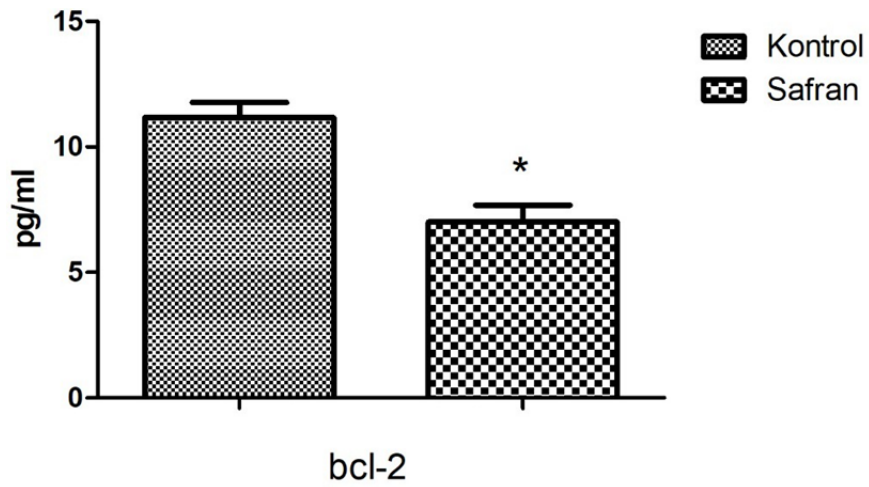
Safranın hücre kültüründe artan dozlarda uygulanması sonucu melanom hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.



Şekil 12. Safranin melanom cilt kanserindeki MTT sonuçları

4.2. Safranin Bcl-2 Düzeyine Etkisi

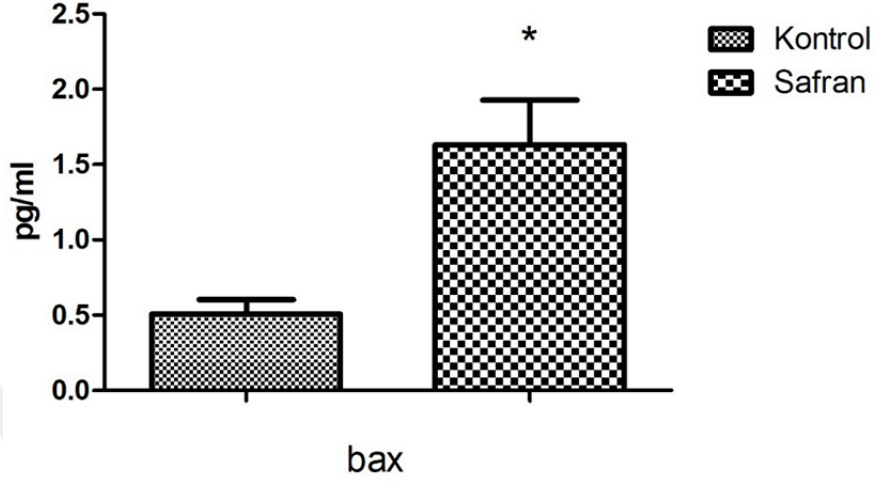
Safran uygulaması sonucu anti-apoptotik faktör olan bcl-2 protein düzeyi önemli ölçüde azalmıştır.



Şekil 13. Safranin melanom cilt kanserindeki bcl-2 ekspresyonuna etkisi

4.3. Safranin Bax Proteinini Üzerine Etkisi

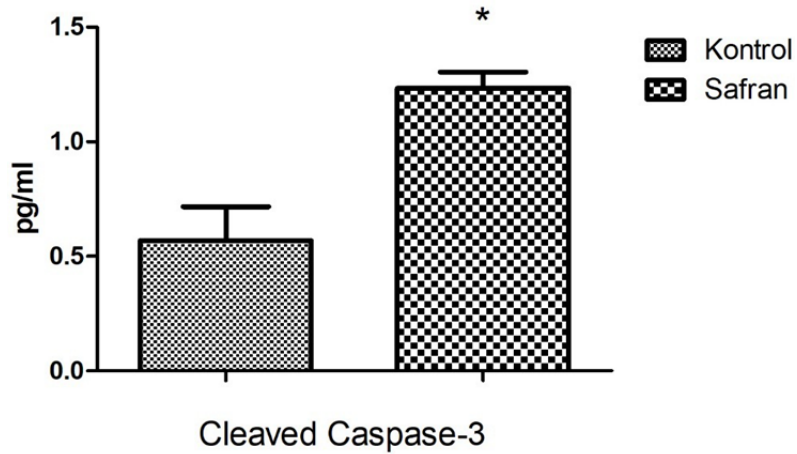
Safran uygulaması sonucu apoptozu indükleyen bir faktör olan bax proteini düzeyi önemli ölçüde artmıştır.



Şekil 14. Safranin melanom cilt kanserindeki Bax ekspresyonuna etkisi

4.4. Safranin Kaspaz-3 Düzeyine Etkisi

Melanom cilt kanseri hücreleri üzerine hücre kültürü çalışmalarında safran bitkisi ekstraktı apoptozu indükleyen önemli bir faktör olan kaspaz-3 protein düzeyini önemli ölçüde arttırmıştır.



Şekil 15. Safranin melanom cilt kanserindeki Kaspaz-3 proteini ekspresyonuna etkisi

4.5. Safranin weel, AIF, gadd153 ve grp78 Proteinleri Ekspresyonları Üzerine Etkileri

Hücre kültürü çalışması sonucu safranin apoptozu indükleyen faktörler; weel, gadd153, gadd153 ve grp78 düzeyini yükselttiği tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Safranin weel, AIF, gadd153 ve grp78 proteinlerinin ekspresyonları üzerine etkileri

Table I	Control	Safronne
weel	0.45±0.05 pg/ml	0.55±0.02 pg/ml*
AIF	0.8 ±0.05 pg/ml	1.2±0.13 pg/ml*
gadd153	0.66±0.09 pg/ml	1.5±0.19 pg/ml*
grp78	0.73±0.02 pg/ml	1.12±0.18 pg/ml*

Bu çalışmada, safranin cilt kanseri hücrelerinde antiapoptotik bir protein olan bcl-2 seviyesini önemli ölçüde azaltırken, bax, AIF, kaspaz-3, weel-1, grp78, ve gadd153 proteini düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır. Ayrıca, safranin cilt kanseri hücrelerinde proliferasyonu doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe ettiği gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Safran, tıpta damar hastalıkları, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığı tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır^{73,74}. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, safran ve bileşenlerinin, antioksidan aktivite, kanser hücrelerinin apoptozu, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, hücre farklılaşmasının artırılması ve hücre döngüsünün modülasyonu yoluyla antikanser etki gösterdiği ifade edilmiştir^{75,76}.

Bu çalışmada endoplazmik retikulum stresi ve apoptoz yolları analiz edilerek safranın antikanser aktivitesinin moleküler mekanizmasının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Crocus sativus L. çiçeğinden elde edilen bir baharat olan safran, karotenoidler açısından zengindir. Safranın iki ana karotenoidi, krosin ve krosetindir. Klinik araştırmalar, bazı karotenoidlerin diyetle alımının hem in vitro hem de in vivo olarak güçlü antitümör etkileri olduğunu göstermiştir, bu da onların çeşitli dokularda potansiyel olarak kanseri önleyici ve/veya tedavi edici etkilerinin olabileceğine işaret etmektedir⁷⁵.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre antigenotoksik ve sitotoksik etkileri belirlenen safranın bu etkileri içeriğindeki flavonoid ve karotenoid oranlarının yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir. Flavonoid ve karotenoidlerle daha önce yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin antioksidan, antigenotoksik, antienflamatuvar etki gösterdiği, hücre döngüsünün durdurulması, anjiyogenezin engellenmesi, apoptozun indüklenmesi, karsinojenik maddenin inaktivasyonu, tümör hücrelerinin gelişiminin ve kanser hücrelerinin çoğalmasının engellenmesi gibi mekanizmalarla antikarsinojen etki yarattığı bildirilmiştir^{13,15,16}. Bununla birlikte, safranın ve ana bileşenlerinin kesin antikanser mekanizmaları hala büyük ölçüde belirsizdir ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Krosin, safranın ana aktif bileşenidir ve daha önce yapılan çalışmalar ile gösterildiği üzere kanser hücresi proliferasyonunu inhibe etmekte ve nükleik asit sentezini indükleyen enzimlerin inhibisyonu ile hücre apoptozunu indüklemektedir^{75,77}.

Krosinin ayrıca karaciğer kanserinin önlenmesinde koruyucu rol oynadığı, kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir⁷⁸.

Krosinin gıda ürünlerinde bol miktarda bulunması ve birçok araştırmada göre toksik etkisinin görülmemesi, kansere karşı etkisini daha da çekici kılmaktadır⁷⁹.

Safranın diğer bir karotenoid bileşeni olan krosetin, hayvan modellerinde ve hücre kültürü çalışmalarında antitümör etki göstermiştir. Krosetin, nükleik asit sentezini inhibe ederek, antioksidatif sistemi güçlendirerek, apoptozu indükleyerek ve büyüme faktörünün sinyal yollarını engelleyerek kanser hücrelerinin büyümesini olumsuz etkilediği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca krosetin, sisplatin ile birlikte sinerjik bir antikanser etkiye sahiptir⁸⁰.

Emin ve ark. (2011), safranın hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu yoluyla karaciğer kanserine karşı koruyucu etki gösterdiğini bulmuştur⁸¹.

Tüm kanser tedavilerinin amacı, kanser hücre ölümünü artırmaktır. Bu çalışmada safran kaynaklı apoptozu vurgu yapılmıştır. Apoptoz, hücre ölümü olarak da bilinmektedir. Safranın kanseri önlemedeki tüm etki mekanizmaları önemlidir, ancak apoptozun kendisini indüklemesi daha fazla ön plana çıkmaktadır.

Bcl-2 gen ailesi, apoptoz sürecinde önemli bir düzenleyici protein türüdür. Bu ailedeki pro-apoptotik proteinler ve anti-apoptotik proteinlerin dengesi, hücrelerin hayatta kalması ve ölmesi arasındaki dengeyi etkilemektedir. Hücreler bir hayatta kalma sinyali aldığında, Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-w gibi anti-apoptotik moleküller aktive olur. Buna karşılık, Bid, Bax gibi pro-apoptotik protein, hücreler pro-apoptotik sinyali aldığında hücrelerin apoptozisini indüklemek için aktive olmaktadır. Kaspazlar da, "kaspaz bağımlı apoptoz yolağı"na da ismini veren, apoptozda önemli rol oynayan, sistein-proteaz grubu enzimlerdir.

Çalışmamızda kanser hücrelerine safran uygulaması sonrasında bax/bcl-2 oranı ile kaspaz-3 düzeyinin ve dolayısıyla apoptoz oranının arttığı gösterilmiştir. Bulduğumuz sonuç daha önce meme kanseri tümör dokusunda ve mide adenokarsinomunda yapılan çalışmada bulunan sonuçlar ile paralellik göstermektedir^{76,82,83}.

Homeostazi yeniden sağlayan veya hücreyi ölüme yönlendiren endoplazmik retikulum (ER) stresi, çeşitli faktörler ve ER stres aracı molekülleri tarafından aktive edilmektedir. Pek çok çalışma, ER stresi ile kanser arasındaki ilişkiyi ve özellikle ER stres aracı molekülleri ile göstermiştir. Bu çalışmada safran, ER stresini gösteren aracı moleküller olan gadd153 ve grp78'i artırarak ER stresini indüklemiştir. Elde ettiğimiz sonuç daha önce yapılmış olan çalışmalar ile uyumludur⁸⁴.

Apoptoz indükleyici faktör (AIF), hücre ölümü sırasında, mitokondriyal intermembran boşluğundan çekirdeğe geçen, kaspaz yolağından bağımsız bir apoptoz efektörüdür. Bir protein kinaz olan Wee1 inhibisyonu da, kanser tedavisinde terapötik bir hedef olarak öne çıkmaktadır^{85,86}.

Bu çalışmada safranın cilt kanseri hücrelerinin çoğalmasını engelleyebileceği ve apoptozu indükleyebileceği gösterilmiştir. Safran cilt kanseri hücrelerinde antiapoptotik protein olan bcl-2'nin düzeyini anlamlı önemli ölçüde düşürürken, apoptotik kaspaz-3, bax, wee-1, AIF, gadd153 ve grp78 proteinlerini anlamlı olarak arttırmıştır.

Safranın antikanser etkilerini hangi mekanizmalar aracılığıyla oluşturduğu halen kesin olarak bilinmese de bu etkileri direkt veya indirekt birçok mekanizma ile gösterdiği ortaya konulmuştur. Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile farklı kanser hücre hatlarında safranın etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

Yaptığımız çalışma safranın, tümör ilerlemesini önlemek ve/veya kanseri tedavi etmek için tek başına veya modern tedavi protokolleri ile kombinasyon halinde faydalı olabileceğini göstermiş ve gelecek çalışmalara ışık tutmuştur.

Bu çalışma safranın özellikle cilt kanseri tedavisi üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Safran kanser hücrelerini ölüme yönlendirirken çeşitli kemoterapötiklerle sinerjistik etki gösterebilir.

Daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak bu çalışma ile de antigenotoksik ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri saptanan safran bitkisinin baharat ve gıda gibi tüketim yollarının yanısıra, bu bitkiden elde edilen ekstraktlar gıda katkı maddesi (renklendirme, aroma verme, antioksidan özellik kazandırma vb.) olarak da kullanılabilir. Hazır gıdaların hemen hepsinde bulunan sentetik gıda katkı maddelerinin yerine doğal bitki ekstraktlarının kullanıma sunulmasıyla insanlarda gıda kaynaklı kimyasalların vücuda alımı indirgenerek bu kimyasalların insanlardaki zararlı etkileri azaltılabilir. Gıdalarda sentetik gıda katkı maddelerine alternatif olarak, antigenotoksik ve antioksidan etkileri olan doğal katkı maddelerinin kullanılması ile özellikle genç nesilde mutasyon birikimi azaltılabilir, bu yolla mutasyon kaynaklı hastalıkların ortaya çıkışı geciktirilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Safran antik çağlardan günümüze kadar bir alternatif tedavi seçeneği olarak kabul edilmiştir ve dünyanın en pahalı baharatlarından biridir. Safranın antikanserojen aktivitesi ilk olarak 1990'ların başında rapor edilmiş ve bu konudaki araştırmalar son on yılda artarak devam etmiştir. Safran ve ana bileşenlerinin antikanserojenik ve antitümör etkilerine ilişkin in vivo ve in vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Kanser gelişimi; başlangıç yaşı, yayılabilirlik ve tedaviye yanıt gibi parametreler ile değişkenlik göstermekte ve dünya genelinde sağlık için büyük bir tehdit olarak kabul edilmektedir. Modern tedavi yöntemleri, tüm kanser olgularında iyileşmeyi tam anlamıyla başaramamış ve bu da araştırmacıları alternatif tedavi seçeneklerini araştırmaya yöneltmiştir. Son yıllarda uygulanan bitkisel tedaviler çoğunlukla destekleyici veya tamamlayıcı tedavi işlevi görmektedir. Bitkisel preparatlar ile hastalığın hem önlenmesi hem de tedavisi, kanser ölüm oranını önemli ölçüde azaltmaya yardımcı olmaktadır. Bitkisel tedavinin ameliyattan iyileşme süresini kısalttığı, geleneksel tedavilerin yan etkilerini azalttığı, iyileşmeye yardımcı olmak için iştahı ve uyku kalitesini artırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca kemoterapi ve radyoterapi sonrasında mümkün olduğunca sağlıklı hücreleri ve dokuları korumakta olduğu birçok araştırmada saptanmıştır. Son araştırmalar, yenilebilir birçok meyve, sebze ve baharatın kanser insidansını azaltabilecek kimyasallar içerdiğini göstermektedir.

Cilt kanseri, küresel çapta ve ülkemizde artan görülme sıklığı ile dikkat çekmektedir. Cilt kanserinin etiyolojisinde öne çıkan faktör ultraviyole ışınlarıdır. İçinde bulunduğumuz yüzyılda ozon tabakasındaki belirgin incelmeyle, UV ışınlarına daha yoğun bir biçimde maruz kalınmakta, bu durum da cilt kanserinin görülmesinde önemli bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Güneş ışınlarından korunmada önlem almanın yaygınlaştırılması, insanların güneş ışınlarındaki radyasyona maruziyetinin azaltılması, cilt kanserlerinin tedavi yükünün azaltılmasının en önemli parçasıdır.

Cilt kanseri gibi malign hastalıklardan korunmada ve bu hastalıkların tedavisinde, bitkisel tedavi ve benzeri alternatif yöntemler ön plana çıkmaktadır. Bitkisel ekstraksiyon içeren gıdalar, ekstraksiyonda bulunan ve sağlığa olumlu etkileri olduğu bilinen yağ asitleri, flavonoid, fenolik bileşikler ve karotenoid gibi bileşenler ile fonksiyonel gıda haline getirilebilmektedir. Gıdaların üretiminde doğal katkı maddelerinin kullanılması sayesinde olumsuz etkileri olan sentetik katkı maddelerinin organizmaya alınmasının önleneyeceği gibi, günlük hayatta karşılaşılan genotoksinlere karşı doğal katkı maddelerinin bulundurdıkları potansiyelden de yararlanılabilmektedir.

Çeşitli bitkiler ve bitki bileşenlerinin yapılan birçok araştırma ile olumlu etkileri gösterilmiştir. Bununla birlikte, tek başlarına alındıklarında gösterdikleri olumlu etkiyi vücuda alınan diğer ilaç ve gıda gibi bazı maddelerle etkileşime girmeleri sonucu gösteremeyebildikleri ya da istenmeyen bazı etkilere neden oldukları gösterilmiştir. Özellikle kanser gibi immün sistemin zayıfladığı ve tedavisinde birçok yan etkisi olan ilaçların kullanıldığı hastalıklarda, tedavi amaçlı kullanılmadan önce test edilmelidirler. Günümüze kadar çeşitli fiziksel etmenlerin (ısı, ışın, sıcaklık), kimyasalların, gıda katkı maddelerinin, ilaçların ve kozmetiklerin karsinogenik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacı ile birçok test sistemleri geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Söz konusu test sistemlerinin herbirinin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Sonuç olarak yaptığımız çalışma da, safran melanoma hücre hattında ER stresini ve bcl-2/bax, kaspaz-3, AIF proteinleri ile apoptozu indüklemiştir. Melanom cilt kanserinin yayılımını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışma safran üzerine yapılması gereken bir sonraki aşama olan hayvan deneyi araştırmalarına da ışık tutmaktadır.

Safranın güncel tedavilere katkıda bulunan tamamlayıcı bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak rutin uygulanacak bir tedavi protokolü oluşturulması için hem in vivo hem de klinik olarak daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. **Umadevi M, Kumar KPS, Bhowmik D, Duraivel S.** Traditionally Used Anticancer Herbs In India. *Journal of Medicinal Plants Studies*, **2013**; 1(3): 56-74,.
2. **Safarzadeh E, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B.** Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Adv Pharm Bull*, 4 (Suppl 1): **2014**; 421-7.
3. **Prema R, Sathish Sekar D, Chandra Sekhar KB.** Review On: Herbs As Anticancer Agents. *Int. J. Pharma & Ind. Res.*, **2011**; 1-105.
4. **Agarwal N, Majee C, Chakraborty GS.** Natural Herbs as Anticancer Drugs. *International Journal of PharmTech Research*, **2012**; 4(3): 1142-1153.
5. **Kasapović J, Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Pajović SB.** Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem. Funct.* **2008**; 26: 723-730.
6. **Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ.** Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **2014**; 1845(1): 20-30.
7. **Khazdair MR, Boskabady MH, Hosseini M, Rezaee R, Tsatsakis AM.** The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A review, *Avicenna J Phytomed.* Sep-Oct; **2015**; 5(5): 376-391.
8. **Melnyk JP, Wang S, Marcone MF.** Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron *Food Research International* **2010**; 43: 1981– 1989.
9. *Crocus sativus* morfolojik yapısı Erişim: (<https://gezenadam.com/biota/species.php?ID=793>) Erişim: 12.09.2022
10. **Goli AH, Mokhtari F, Rahimmalek M.** Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal Sayed, *Journal of Agricultural Science*, **2012**; 4, 10.
11. **Hoshyar R, Bathaie SZ.** Circular dichroism (CD) studies of the interaction between G-quadruplexes/ I-motif with saffron secondary active metabolites, **2013**.
12. **Mashmoul M, Azlan A, Yusof BNM, Khaza'ai H, Mohtarrudin N, Boroushaki MT.** Effects of saffron extract and crocin on anthropometrical, nutritional and lipid profile parameters of rats fed a high fat diet. *Journal of Functional Foods* **2014**; 8: 180-187.
13. **Hosseinzadeh H, Abootorabi A, Sadeghnia HR.** Protective Effect of *Crocus sativus* Stigma Extract and Crocin (trans-crocin 4) on Methyl Methanesulfonate–Induced DNA Damage in Mice Organs, Dna and Cell Biology, **2008**; 27: 1-8.
14. **Samarghandian S, Borji A, Farahmand SK, Afshari R, Davoodi S.** *Crocus sativus* L. (saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation. *BioMed research international*, **2013**, 2013: 417928.
15. **Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A.** Protective effects of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Phytother Res*, **2003**; 17(6): 614-7.
16. **Nair SC, Pannikar B, Panikkar KR.** Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Letters*, **1991**; 57(2): 109-114.

17. **Malaekheh-Nikouei B, Mousavi SH, Shahsavand S, Mehri S, Nassirli H, Moallem SA.** Assessment of Cytotoxic Properties of Safranal and Nanoliposomal Safranal in Various Cancer Cell Lines. *Phytotherapy Research*, **2013**; 27: 1868-1873.
18. **Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernández JA.** Crocin, safranal and picocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, **1996**; 100: 23-30.
19. **Abdullaev FI.** Inhibitory effect of crocetin on intracellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cells. *Toxicology Letters*, **1994**; 70(2): 243-251.
20. **Abdullaev FI, Riverón-Negrete L, Caballero-Ortega H, Manuel Hernández J, Pérez- López I, Pereda-Miranda R, Espinosa-Aguirre JJ.** Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicol In Vitro*, **2003**; 17(5-6): 731-736.
21. **Magesh V, Venugopal R, Bhavani KD, Sakthisekaran D.** Effect of Crocetin on Benzo(a) Pyrene Induced Lung Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *International Journal of Cancer Research*, **2007**; 3: 143-150.
22. **Tanaka T, Mori T, Yuan CS, Soed S, Tung NH, Shoyama Y.** The Function of Saffron and its Constituent in Gastroenterological Tissues. *Global Journal of Gastroenterology & Hepatology*, **2015**; 3(2): 31-38.
23. **Das I, Chakrabarty RN, Das S.** Saffron Can Prevent Chemically Induced Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **2004**; 5: 70-76.
24. **Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP.** Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother. Res.*, **2005**; 19(11): 997-1000.
25. **Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A.** Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia- reperfusion-induced oxidative damage in rats, *J Pharm Pharmaceut Sci*, **2005**; 8(3): 387-393.
26. **Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Jaafar HZ.** Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, **2010**; 15(9): 6244-6256.
27. **Doak SH, Liu Y, Chen C.** Genotoxicity and Cancer. In *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials* 1st ed., Edited by Fadeel B, Pietroiusti A, Shvedova A. Academic Press, USA, pp. **2012**; 243-261.
28. **Atlı Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V.** Genetik Toksisite Testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, **2011**; 4(3), 221-229.
29. **Ray PD, Huang B, Tsuji Y.** Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* **2012**; 24, 981-990.
30. **Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **2006**; 160, 1-40.
31. **Thannickal VJ, Fanburg BL.** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2000**; 279, L1005-L1028.
32. **Schieber M, Chandel NS.** ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* **2014**; 24, R453-R462.

33. **Cairns RA, Harris IS, Mak TW.** Regulation of cancer cell metabolism. *Natur Review Cancer*, **2011**; 11(2): 85-95.
34. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5.ed.Oxford University Press, Oxford, **2015**.
35. **Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C.** New insights into the role of mitochondria in aging: Mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* **2010**; 123, 2533-2542.
36. **Çelik N.** Parakuat kullanılarak deneysel oksidatif stres oluşturulan a549 akciğer epitel hücreleri üzerine farklı dozlarda uygulanan kafeik asit fenetil esterinin biyokimyasal etkisinin araştırılması, Afyon, **2020**.
37. **Westerdahl J, Ingvar C, Masback A.** Sunscreen use and malignant melanoma. *International Journal of Cancer*, **2000**; 87(1): 145-150.
38. **Knowles MA, Selby PJ.** *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Oxford University, New York, **2005**.
39. **Koca HB.** Prostat Kanseri Hücre Kültürü Üzerine Acorus Calamus Bitkisi Ekstraktının Etkisi. Eskişehir, **2013**.
40. **Bozzone DM.** *Cancer genetics*. Chelsea House, New York, **2007**.
41. **Klug W, Cummings M.** *Genetik kavramlar*. Palme Yayıncılık, Ankara, **2008**.
42. **Aktürk A, Yıldız DK, Bilen N, Bayramgüller D, Kıran N, Onyedi M.** Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesine 1996-2003 yılları arasında başvuran deri kanseri olguları. *Türkiye Klinikleri Journal of Dermatology*, **2006**; 16:44-49.
43. **Toouli J, Russell C, Devitt P, Clark IC.** *Integrated Basic Surgical Science*, Edit: Terzi C., Dokuz Eylül Yayınları, Uşak Matbacılık Ltd. Şti, İzmir, **2002**.
44. **Hunter S, Love-Jackson K, Abdulla R, Zhu W, Lee JH, Wells KJ, Roetzheim R.** Sun protection at elementary schools: a cluster randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, **2010**; 102(7): 484-492.
45. **Koh D, Wang H, Lee J, Chia KS, Lee HP, Goh CL.** Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin: analysis of the Singapore cancer registry data 1968-1997. *British Journal of Dermatology*, **2003**; 148: 1161-1167.
46. **Li J, Uter W, Pfahlberg A, Gefeller O.** A comparison of patterns of sun protection during beach holidays and everyday outdoor activities in a population sample of young German children. *British Journal of Dermatology*, **2012**; 166: 803-810.
47. **Youl PH, Janda M, Aitken JF, DelMar CB, Whiteman DC.** Body site distribution of skin cancer, pre-malignant and common benign pigmented lesions excised in general practice. *British Journal of Dermatology*, **2011**; 165: 35-43.
48. **Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M.** Cancer statistics, 2009. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2009**; 59: 225-249.
49. **Uslu M, Karaman G, Şendur N.** Adnan Menderes Üniversitesi hekimlerinin deri kanserleri ve güneşin etkileri konusundaki bilgi düzeyleri ile güneşten korunma davranışlarının değerlendirilmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2006**; 7(1): 5-10.

50. **Ülkür E, Karagöz H, Açık C, Yüksel F, Çeliköz B.** The recurrence frequency of nonmelanotic skin cancers: a retrospective analysis over 11 years, *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, **2005**; 36:189-193.
51. **American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016.** Atlanta: American Cancer Society; **2016.** p.14.
52. **Holdenrieder S, Stieber P.** Circulating apoptotic markers in the management of non- small cell lung cancer. *Cancer Biomark.* **2010**; 6: 197-210.
53. **Curtin JF, Cotter TG.** Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal* **2003**; 15: 983-92.
54. Apoptozis geçiren bir hücre şeması. Erişim: (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Apoptozis>) Erişim tarihi: 16.07.2022.
55. **Bennett DC.** Genetics of melanoma progression: the rise and fall of cell senescence. *Pigment Cell Melanoma Res* **2015**; 29: 122-140.
56. **Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT.** Antiapoptosis and cell survival. *Biochim Biophys Acta* **2011**; 1813: 238-59.
57. **Cory S, Adams JM.** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2002**; 2: 647- 56. h
58. Programlı Hücre Ölümü: Apoptosis (Apoptoz) Nedir? Canlılar Neden Hücrelerini Bilerek Öldürürler? Erişim: (<https://evrimagaci.org/programli-hucre-olumu-apoptosis-apoptoz-nedir-canlilar-neden-hucrelerini-bilerek-oldururler-257>) Erişim tarihi: 26.07.2022
59. **Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria. *Genes Cell* **1998**; 3: 697-707.
60. **Raghav PK, Kumar R, Kumar V, Raghava GPS.** Docking-based approach for identification of mutations that disrupt binding between Bcl-2 and Bax proteins: Inducing apoptosis in cancer cells. *Mol Genet Genomic Med.* **2019**; 7:e910.
61. **Adams JM, Cory S.** Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends Biochem Sci* **2001**; 26: 61-6.
62. **King KL, Cidlowski JA.** Cell cycle regulation and apoptosis. *Ann Rev Physiol* **1998**; 60: 601-17.
63. **Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR.** Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* **2003**; 36: 165-75.
64. **Aslan A.** Apoptozun Kilit Enzimleri: Kaspazlar. *Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biruni Üniversitesi* Erişim: (<https://www.bezelyedergi.net/post/apoptozun-kilit-enzimleri-kaspazlar>) Erişim tarihi: **06.06.2022.**
65. **Adrain C, Martin SJ.** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* **2001**; 26: 390-7
66. **Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: critical control points. *Cell* **2004**; 116: 205-19.
67. **Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, et al.** Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* **1999**; 107: 489-506.
68. Opposing roles of AIF in Apoptosis and Cell Survival Erişim: (<https://m.antpedia.com/news/2320328.html>) Erişim tarihi: 15.05.2022

69. **Salgame P, Varadhachary AS, Primiano LL, Fincke JE, Muller S, Monestier M.** An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, **1997**; 25(3): 680–681.
70. Çalışkan N. Tıbbi Laboratuvar Teknikleri, İmmünoloji Yöntemler. Erişim: (<https://avys.omu.edu.tr>) Erişim Tarihi: **18.08.2022**
71. **Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C.** Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, **1998**; 3: 115.
72. **Pınarbaşı E.** Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in) *Moleküler Biyoloji*. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), **2007**; 423-468, Nobel Yayın, Ankara.
73. **Asil H.** Safran'ın (*Crocus sativus* L.) Tıbbi ve Farmakolojik Özellikleri, 1.International Mersin Symposium, Conference Proceedings **2018**; 2, 145–155.
74. **Çıtak EÇ.** Apoptosis and cancer. *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, **2000**; 9(3),183–91.
75. **Hoshyar R, Mollaei H.** A comprehensive review on anticancer mechanisms of the main carotenoid of saffron, crocin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2017**; 69(11):p. 1419-1427.
76. **Moradzadeh M, Sadeghnia HR, Tabarraei A, Sahebkar A.** Anti-tumor effects of crocetin and related molecular targets. *J Cell Physiol*. **2018**; 233(3):2170-2182.
77. **Hoshyar R, Bathaie SZ, Sadeghizadeh M.** Crocin Triggers the Apoptosis through Increasing the Bax/Bcl-2 Ratio and Caspase Activation in Human Gastric Adenocarcinoma, AGS, Cells. *DNA and Cell Biology*, **2013**; 32(2): p. 50–57.
78. **Amin A, Hamza AA, Bajbouj K, Ashraf SS, Daoud S.** Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **2011**; 2;54(3):857-67.
79. **Aziz AUR, Farid S, Qin K, Wang H, Liu B.** PIM Kinases and Their Relevance to the PI3K/AKT/mTOR Pathway in the Regulation of Ovarian Cancer. *Biomolecules*. **2018**; 4;8(1):7.
80. **Gutheil WG, Reed G, Ray A, Anant S, Dhar A.** Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. **2012**; 13(1):173-9.
81. **Zhang Z, Wang CZ, Wen XD, Shoyama Y, Yuan CS.** Role of saffron and its constituents on cancer chemoprevention. *Pharm Biol*. **2013**; 51(7):920-4
82. **Ahmadabadi F, Saghebjo M, Hedayati M, Hoshyar R, Huang CJ.** Treatment-induced tumor cell apoptosis following high-intensity interval training and saffron aqueous extract in mice with breast cancer. *Physiol Int*. **2021**; 14.
83. **Jahromi AS, Kargar M, Kafizadeh F, Jamalidoust M, Moradzadeh M.** Crocin Promotes Apoptosis in Human EBV-Transformed B-Lymphocyte via Intrinsic Pathway. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. **2021**; 13(1):e2021049.
84. **Wang WA, Groenendyk J,** and Michalak Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **2014**; 1843(10): p. 2143-2149
85. **Rao S, Mondragón L, Pranjić B, Hanada T, Stoll G, Köcher T, Zhang P, Jais A, Lercher A, Berghaler A, Schramek D, Haigh K, Sica V, Leduc M, Modjtahedi N, Pai TP, Onji M, Uribealago I, Hanada R, Kozieradzki I, Kogelgruber R, Cronin SJ, She Z, Quehenberger F, Popper H, Kenner L, Haigh JJ, Kepp O, Rak M, Cai K, Kroemer G, Penninger JM.** AIF-regulated oxidative phosphorylation supports lung cancer development. *Cell Res*. **2019**; Jul;29(7):579-591.

86. **Ghelli Luserna di Rorà A, Cerchione C, Martinelli G, Simonetti G.** A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target. *J Hematol Oncol.* **2020**; Sep 21;13(1):126.



ÖZGEÇMİŞ

