

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ALFA-LİNOLENİK ASİT (OMEGA-3) VE VİTAMİN D’NİN
KOLON KANSERİ HÜCRE DİZİSİ SW480 ÜZERİNDE
ANTİPROLİFERATİF, APOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nurhan GÜNAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-15020 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Nurhan GÜNAY tarafından hazırlanan “Alfa-Linolenik Asit (Omega-3) ve Vitamin D’nin Kolon Kanseri Hücre Dizisi SW480 Üzerinde Antiproliferatif, Apoptotik ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/05/2018

Ünvan	Adı Soyadı	Üniversite	İmza
Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL		Adnan Menderes Üniversitesi	
Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN		Adnan Menderes Üniversitesi	
Prof. Dr. Çiğdem YENİSE		Adnan Menderes Üniversitesi	
Prof. Dr. Pınar AKAN		Dokuz Eylül Üniversitesi	
Doç. Dr. Özge ÇEVİK		Adnan Menderes Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda; öncelikle birlikte çalıştığım çok değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL'a emeklerinden dolayı saygılarımı sunar ve çok teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında verdiği destek ve katkılardan dolayı ilgisi, anlayışı ve nezaketi için çok değerli hocam II. Danışmanım Doç.Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e çok teşekkür eder, şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Çalışmamda laboratuvarlarında misafir olduğum güler yüzleriyle elit bir çalışma ortamı sağlayan, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli Hocalarım Prof. Dr. Serhan SAKARYA ve Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a ve ADÜ Tıp Fakültesi REDPROM Araştırma Laboratuvarında çalışan, yüksek lisans ve doktora yapan bütün çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmamda uzun uğraşlarda destek olan ADÜ Biyokimya Tıp Asistanları Ömer ERDOĞAN, Burçin İrem ABAS ve Fatih BİRTEKOCAK'a çok teşekkür ederim.

İstatistik değerlendirmelerde destek olan ve beni yönlendiren çok değerli Hocam Öğr. Gör. Dr. Hüseyin Nail AKGÜL'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen, yol gösteren çok değerli Hocam, Köşk MYO Müdürü Doç. Dr. Ayşe Demet KARAMAN'a saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Beni bugünlere getiren, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve varlıklarıyla bana daima güç veren çok kıymetli annem ve babam Şerife ve Ahmet BOZKAYA'ya ve ablası olmakla iftihar ettiğim kardeşlerim, Doç. Dr. Canan BOZKAYA, Dr. Öğr. Üyesi Nuray ÖKTEM ve Emre BOZKAYA'ya çok teşekkür ediyorum, iyi ki varsınız.

Son olarak tez çalışmam süresince beni evde bekleyen çocuklarım, dünyanın en güzel meyveleri Ayşe Nihan GÜNAY, Mehmet Çağrı GÜNAY ve Zeynep GÜNAY'a ve onlarla ilgilenip, benim huzurlu bir şekilde çalışmamı sağlayan, asla şikayet etmeyen en büyük dayanağım, çok kıymetli eşim, ömrümün ortağı Nazmi Alparslan GÜNAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu yüksek lisans tezini çocuklarım ve eşime armağan ediyorum, onları çok seviyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. D Vitamini	4
2.2.1. D Vitamininin Yapısı, Sentezi ve Metabolizması	6
2.2.1.1. Parathormonun Etkisi	11
2.2.1.2. Kalsitonin Etkisi	11
2.2.1.3. Östrojen Etkisi	11
2.2.2. D Vitamini ve Kanser	12
2.3 α -Linolenik Asit.....	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarflar	21
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	22
3.3. Yöntem	23
3.3.1. Hücrelerin Pasajlanması	24
3.3.2. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü	25
3.3.3. Hücrelerin Dondurulması	26
3.3.3.1. SW480 Hücreleri için Dondurma Besiyeri Hazırlanması	27
3.3.4. Hücre Kültürü Uygulaması.....	27
3.3.4.1. WST-1 Analizi için Hücre Kültürü Çalışması.....	27
3.3.4.2. BCA Protein, Annexin V, GPx, SOD, NO ve MDA Analizleri için Hücre Kültürü Çalışması	28
3.3.4.2.1. BCA Protein, GPx, SOD, NO ve MDA Analizleri için Lizat Eldesi	29

3.3.5. Analizler	29
3.3.5.1. WST-1 Testi	29
3.3.5.2. BCA Total Protein Tayini.....	31
3.3.5.2.1. BCA Protokolü	31
3.3.5.3. MDA Tayini	32
3.3.5.3.1. MDA Protokolü	33
3.3.5.4. NO Tayini	34
3.3.5.4.1. Kimyasal Hazırlama	34
3.3.5.4.2. NO Protokolü.....	35
3.3.5.5. GSH-Px (GPx) Tayini	35
3.3.5.5.1. Kimyasal Hazırlama	36
3.3.5.5.2. GSH-Px Protokolü.....	36
3.3.5.6. SOD Tayini.....	37
3.3.5.6.1. Kimyasal Hazırlama	38
3.3.5.6.2. Lizatın Hazırlanması	38
3.3.5.6.3. SOD Protokolü	39
3.3.5.7. Annexin V Protokolü.....	39
3.4. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR	41
4.1. D vitamini, α -Linolenik Asit ve α -Linolenik Asit+D vitamininin SW480 Hücrelerinde Sitotoksisite, Proliferasyon Üzerine Etkileri.....	41
4.1.1. Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinin WST-1 ile Analizi	43
4.1.2. Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinin WST-1 ile Analizi.....	46
4.1.3. Farklı α -Linolenik Asit+D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinin WST-1 ile Analizi	49
4.1.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının WST-1 Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması	53
4.2. Apoptozis Analizi	53
4.2.1. D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 hücrelerinin Apoptozis Analizi	54
4.2.2. α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında SW480 hücrelerinin Apoptozis Analizi.....	55

4.2.3. α -Linolenik Asit-D vitamini Konsantrasyonlarında SW480 hücrelerinin Apoptozis Analizi.....	56
4.3. Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi	57
4.3.1. Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinde Total Protein Miktar Tayini	57
4.3.2. Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinde Total Protein Miktar Tayini.....	59
4.3.3. Farklı α -Linolenik Asit+D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinde Total Protein Miktar Tayini.....	61
4.3.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının Total Protein Tayini Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	63
4.4. MDA Analizi.....	64
4.4.1. SW480 Hücrelerinin Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında MDA Analizi.....	64
4.4.2. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında MDA Analizi.....	65
4.4.3. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit+D vitamini Konsantrasyonlarında MDA Analizi	66
4.4.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının MDA Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması	68
4.5. NO Analizi.....	69
4.5.1. SW480 Hücrelerinin Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında NO Analizi.....	69
4.5.2. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında NO Analizi.....	71
4.5.3. SW480 Hücrelerinin α -Linolenik Asit-D vitamini Konsantrasyonlarında NO Analizi.....	72
4.5.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının NO Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması	74
4.6. GPx Analizi	75
4.6.1. SW480 Hücrelerinin Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında GPx Analizi	75
4.6.2. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında GPx Analizi.....	77
4.6.3. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit-D Vitamini Konsantrasyonlarında GPx Analizi.....	78

4.6.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının GPx Sonuçlarının Karşılaştırılması	80
4.7. SOD Analizi	80
4.7.1. SW480 Hücrelerinin Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında SOD Analizi	80
4.7.2. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında SOD Analizi	82
4.7.3. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit+D Vitamini Konsantrasyonlarında SOD Analizi	83
4.7.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının SOD sonuçlarına göre Karşılaştırılması	85
5. TARTIŞMA.....	86
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	98
KAYNAKLAR.....	101
EKLER	114
ÖZGEÇMİŞ.....	117

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALA	α -Linolenik Asit, Alfa-Linolenik Asit
D	1,25(OH) ₂ D ₃
SOD	Süperoksit Dismütaz
GPx	Glutasyon Peroksidaz
NO	Nitrik Oksit
MDA	Malondialdehit
μM ALA-μM D	μ M- μ M
VDR	D vitamini reseptörü
1,25(OH)₂D₃	1,25 dihidroksi kolekalsiferol, 1,25(OH) ₂ vitamin D, kalsitriol
D₂ vitamini	Ergokalsiferol
D₃ vitamini	Kolekalsiferol
7-DHC	7-dehidrokolesterolden
25(OH)D₃	25-hidroksi vitamin D, kalsidiol
DBP	D vitamini bağlayıcı protein
UV-B	Ultraviyole- B
RXR	Retinoik asit X reseptörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
VDRE	D vitamini cevap elemanı (Vitamin D response element)
PTH	Parathormon
24-OH_{az}	24-hidroksilaz
EPA	Eikosapentaenoik asit
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
HDL	İyi huylu kolesterol
ω-3 veya n-3	Omega-3
ω-6 veya n-6	Omega-6
DMSO	Dimetilsülfoksit
BCA	Bicinchoninic asit
BSA	Sığır serum albümini
TBA	Tiyobarbitürik asit

TBARS	Tiobarbitürük asit ile reaksiyon veren ürünler
TCA	Trikloroasetik asit
NNDA	N-(1-Naphthyl)ethylene-diaminedihydrochloride
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
GR	Glutasyon redüktaz
NBT	Nitroblue tetrazolium
ROS	Reaktif oksijen türleri
EPIC	Avrupa Kanser ve Beslenme Kohortu
GSH	Glutasyon
Kons.	Konsantrasyon
FITC	Floresan izotiyosiyanat
PI	Propidiyum iyodür
7-AAD	7-amino-actinomycin D
PGE	Prostaglandin E2
LOOH	Lipit hidroperoksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. BCA kalibrasyon grafiği	32
Şekil 2. MDA kalibrasyon grafiği	33
Şekil 3. SW480 hücrelerinin D vitamini ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % Canlılık değerleri (n=9)	44
Şekil 4. SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % canlılık değerleri (n=9)	47
Şekil 5. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % Canlılık değerleri (n=9)	50
Şekil 6. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % Canlılık değerleri (n=9)	53
Şekil 7. SW480 hücrelerinin DMSO ve 0,01 μ M D konsantrasyonu ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen apoptoz değerleri	54
Şekil 8. SW480 hücrelerinin ETANOL ve 0,25 μ M ALA konsantrasyonu ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen apoptoz değerleri	55
Şekil 9. SW480 hücrelerinin ETANOL+DMSO ve 0,25-0,01 (μ M- μ M) ALA+D konsantrasyonu ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen apoptoz değerleri	56
Şekil 10. SW480 hücrelerinin D vitamini ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen ortalama toplam protein miktarı değerleri	58
Şekil 11. SW480 hücrelerinin ALA ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen ortalama toplam protein miktarı değerleri	60
Şekil 12. SW480 hücrelerinin ALA+D ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen ortalama toplam protein miktarı değerleri	62
Şekil 13. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen toplam protein değerleri	63
Şekil 14. SW480 hücrelerinin D vitamini uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA değerleri (n=2)	64
Şekil 15. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA değerleri (n=2)	66

Şekil 16. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA değerleri (n=2)	67
Şekil 17. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA değerleri.....	69
Şekil 18. SW480 hücrelerinin D vitamini uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO değerleri (n=2).....	70
Şekil 19. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO değerleri (n=2).....	71
Şekil 20. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO değerleri (n=2).....	73
Şekil 21. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO değerleri	75
Şekil 22. SW480 hücrelerinin D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx değerleri (n=2)	76
Şekil 23. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx değerleri (n=2)	77
Şekil 24. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx ± Standart Sapma değerleri (n=2).....	79
Şekil 25. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx değerleri	80
Şekil 26. SW480 hücrelerinin D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD değerleri (n=2)	81
Şekil 27. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD değerleri (n=2)	82
Şekil 28. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD değerleri (n=2)	84
Şekil 29. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD değerleri	85

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. D ₂ ve D ₃ Moleküllerinin Kimyasal Yapısı (Huerta ve ark, 2002).....	7
Resim 2. Ergosterolden D ₂ Vitamini oluşumu (Akkoyun ve ark, 2014'ten değiştirilerek alınmıştır).....	7
Resim 3. Kolesterolde D ₃ Vitamini oluşumu (Akkoyun ve ark, 2014'ten değiştirilerek alınmıştır.).....	8
Resim 4. D ₃ Vitamininin kimyasal yapısı.....	8
Resim 5. D ₃ Vitamini Sentez Basamakları (Akkoyun ve ark, 2014'ten değiştirilerek alınmıştır.).....	9
Resim 6. D vitamini metabolizması (Özkan ve Döneray, 2011'den değiştirilerek alınmıştır.).....	10
Resim 7. α - Linolenik asitin yapısı ve gösterimi	17
Resim 8. Adherent yapıdaki SW480 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü	24
Resim 9. Doluluk oranı %80-90 aralığına ulaşmış flastaki SW480 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.....	24
Resim 10. SW480 hücrelerinin tripsinle muamele sonrası invert mikroskop görüntüsü....	25
Resim 11. Hücre sayımı için kullanılan toma lamı görüntüsü	26
Resim 12. D vitamini uygulamalarının 72 Saatlik hücre kültürü görüntüleri.....	46
Resim 13. α -Linolenik Asit uygulamalarının 72 saatlik hücre kültürü görüntüleri	48
Resim 14. ALA+D uygulamalarının 72 saatlik hücre kültürü görüntüleri	52

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarflar	21
Tablo 2. Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri	23
Tablo 3. D vitamini, ALA ve D vitamini+ALA konsantrasyonları	30
Tablo 4. 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerde Kontrol grubu, DMSO, ETANOL+DMSO ve ETANOL için ortalama % Canlılık ve % standart sapma değerleri (n=9).....	41
Tablo 5. 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerde D vitamini uygulamaları için ortalama % Canlılık ve % standart sapma değerleri (n=9).....	43
Tablo 6. D vitamini uygulamalarında Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksiyonu grupları için p değerleri	44
Tablo 7. D vitamini uygulamaları ve % Canlılık ± Standart Sapma (n=9)	45
Tablo 8. 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerde ALA uygulamaları için % ortalama canlılık ve standart sapma değerleri (n=9)	47
Tablo 9. α -Linolenik Asit Uygulamalarında Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksiyonu Grupları için p değerleri	48
Tablo 10. 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerde ALA+D uygulamaları için ortalama % Canlılık ve % standart sapma değerleri (n=9).....	49
Tablo 11. ALA+D uygulamalarında Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksiyonu Grupları için p değerleri	51
Tablo 12. 72 saatlik ölçümlerde D vitamini uygulamaları için ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri (n=2)	58
Tablo 13. 72 saatlik ölçümlerde ALA uygulamaları için ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri (n=2)	59
Tablo 14. 72 saatlik ölçümlerde ALA+D uygulamaları için ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri (n=2)	61
Tablo 15. SW480 hücrelerinin D vitamini uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA ± Standart Sapma değerleri (n=2)	64

Tablo 16. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA \pm Standart Sapma değerleri (n=2).....	65
Tablo 17. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA \pm Standart Sapma değerleri (n=2).....	67
Tablo 18. SW480 hücrelerinin D vitamini uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO \pm Standart Sapma değerleri (n=2).....	70
Tablo 19. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO \pm Standart Sapma değerleri (n=2).....	71
Tablo 20. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO \pm Standart Sapma değerleri (n=2).....	73
Tablo 21. SW480 hücrelerinin D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx \pm Standart Sapma değerleri (n=2)	76
Tablo 22. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx \pm Standart Sapma değerleri (n=2)	77
Tablo 23. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx \pm Standart Sapma değerleri (n=2)	78
Tablo 24. SW480 hücrelerinin D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD \pm Standart Sapma değerleri (n=2)	81
Tablo 25. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD \pm Standart Sapma değerleri (n=2)	82
Tablo 26. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD \pm Standart Sapma değerleri (n=2)	83

ÖZET

ALFA-LİNOLENİK ASİT (OMEGA-3) VE VİTAMİN D'NİN KOLON KANSERİ HÜCRE DİZİSİ SW480 ÜZERİNDE ANTİPROLİFERATİF APOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Günay N. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Biyokimya (Tıp) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018.

Günümüzde beslenme şeklinin, hastalıkları önlemede veya hastalıkların tedavisinde oldukça önemli olduğu kabul edilmiş bir olgudur. Dünyada en sık ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer alan kanserde beslenme süreci oldukça önemlidir. Bu nedenle diyetle tüketilen besinlerin ve gıda takviyelerinin, besin maddeleri ve antioksidan içerikleri açısından, kanserli hücelere etkisi araştırılmaktadır. Bu çalışmada gerek besinlerle ve gerekse gıda takviyesi olarak alınabilen Omega-3 kaynağı Alfa-Linolenik Asit (ALA) ve D vitamini kaynağı 1,25(OH)₂D₃'nin (D) hücre proliferasyonu, apoptoz ve antioksidan etkileri SW480 insan kolon kanser hücre dizisi kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmada vitamin D konsantrasyonları arttıkça hücre proliferasyonu ve toplam protein miktarının azalmakta olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir (p<0,05). Farklı D konsantrasyon uygulamalarında, çalışmada kullanılan 0,01µM maksimum D konsantrasyonunun SW480 hücre proliferasyonu üzerinde etkisinin düşük olduğu ve toplam ölüm oranının % 36,95 olduğu tespit edilmiştir. MDA, NO ve GPx miktarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) olup, SOD miktarında anlamlı bir değişim olmamıştır (p>0,05). ALA ve ALA+D konsantrasyon uygulamalarında, konsantrasyon arttıkça hücre proliferasyonu ve toplam protein miktarı azalırken, MDA, NO, SOD ve GPx aktivitelerinin artmakta olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir (p<0,05). D ve ALA'nın SW480 hücreleri üzerinde erken apoptotik etkisi olduğu, ALA+D'nin ise erken ve geç apoptotik etkileri olduğu tespit edilmiştir. SW480 hücreleri için, ALA konsantrasyon uygulamalarında IC₅₀ değeri 0,25 µM, inkübasyon süresi 72 saattir. ALA+D konsantrasyon uygulamalarında ise IC₅₀ değeri 0,25-0,01 (µM ALA-µM D), inkübasyon süresi 72 saattir.

Sonuç olarak, ALA ve ALA+D uygulamalarının apoptotik etkisinin MDA ve NO'daki artış nedeniyle oksidatif stres kaynaklı olabileceği düşünülebilir. Buna karşılık antioksidan savunma sisteminin elemanları olan GPx ve SOD aktivitesindeki artış nedeniyle ALA ve ALA+D konsantrasyonlarının antioksidan etkileri olabileceği de söylenebilir. Ayrıca, D ve ALA'nın bir arada uygulanmasının sitotoksosite üzerinde sinerjik bir etkisi olmadığı

belirlenmiş olup, hatta düşük ALA konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunun arttığı ve MDA, NO, SOD ve GPx aktivitelerini azalttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla düşük ALA+D konsantrasyonlarının yara iyileşmesi gibi hücre proliferasyonunun uyarılması gereken uygulamalarda kullanılabileceği önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kolon Kanseri, Omega-3, α -Linolenik Asit, D vitamini, SOD, GPx, NO, MDA, SW480, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.



ABSTRACT

ANTIPROLIFERATIVE, APOPTOTIC AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF ALPHA-LINOLENIC ACID (OMEGA-3) AND VITAMIN D ON SW480 COLON CANCER CELL LINES

Günay N. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Faculty of Medicine Programme of Biochemistry (Medicine) Master Thesis, Aydın, 2018.

Nowadays, it is an accepted fact that dietary specialization is substantially significant in preventing and treatment of illnesses. It is also quite important in cancer which we see standing in the second position as the most frequent cause of death in the world. For this reason, whether the consumed food within the diet and food supplements, in terms of their nutrients and antioxidant content, has a therapeutic effect on cancer is being researched. In this study, the effects of Alpha-Linolenic Acid (ALA) which is used as the source of Omega-3 and 1.25(OH)₂D₃(D) form of vitamin D, both of which can be taken both with nutrients and as a food supplement, on cell proliferation, apoptosis and oxidative stress have been identified by using SW480 human colon cancer cell line.

In the study, it is statistically determined that increased concentrations of vitamin D treatments decrease cell proliferations and the amount of total protein ($p < 0.05$). The highest D concentration used in this study (0.01 μM) slightly decreased the proliferation of SW480 cells, thus the total apoptotic rate is determined as 36.95 %. Further, the change in MDA, NO and GPx amount is found to be statistically significant in response to different concentrations of vitamin D ($p < 0.05$), whereas no significant change is detected in SOD amount ($p > 0.05$). In response to ALA and ALA+D concentrations, it is statistically determined that as the concentration increases, cell proliferation and amount of total protein decrease, whereas MDA, NO, SOD and GPx activities increase ($p < 0.05$). Combination treatments of D and ALA show early apoptotic effects on SW480 cells whereas ALA+D both early and late apoptotic effects. IC₅₀ value of ALA is determined as 0.25 μM (the incubation duration is 72 hours) in SW480 cells. IC₅₀ value of ALA+D is determined as 0.25-0.01 (μM ALA- μM D), (the incubation duration is 72 hours).

In conclusion, it can be suggested that the apoptotic effects of ALA and ALA+D treatments arise from oxidative stress due to MDA and NO increase. On the other hand due to increasing GPx and SOD activity in response to ALA and ALA+D treatments antioxidant defence system can be also activated. In addition, here it is determined that the

D and ALA treatment together has no synergetic effect on cytotoxicity. Yet, it is found that low ALA concentrations increase the proliferation and decrease MDA, NO, SOD and GPx activities. Thus, here we suggest that low ALA+D concentrations can be applied in the treatments where cell proliferation (such as wound healing) is needed.

Keywords: Colon Cancer, Omega-3, α -Linolenic acid, Vitamin D, SOD, GPx, NO, MDA, SW480, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.



1. GİRİŞ

Günümüzde hastalıkları önlemede veya hastalıkların tedavisinde, hastalığa göre diyetler uygulanmaktadır. Uygulanan diyetlerde kullanılan besinlerin yağ, karbonhidrat, protein, vitamin, mineral ve antioksidan madde içerikleri dikkate alınmakta olup gerektiğinde gıda takviyeleri oral yolla alınmaktadır. Kanserde beslenme süreci oldukça önemli olup, diyetle tüketilen besinlerle, gıda takviyelerinin besin maddeleri ve antioksidan içerikleri açısından tedavi edici olması amaçlanır (Yılmaz, 2010).

Kanser, genetik değişikliklere uğramış hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize olan, yüzden fazla türü olan bir hastalıktır (WHO, 2017).

En çok görülen kanser türleri arasında üçüncü sırada kolon kanseri gelmektedir (Kıdır, 2013). Gastrointestinal kanserler içinde en çok görülen tür olan kolon kanseri; yaş, beslenme alışkanlıkları, yaşanılan bölgenin iklimi ve fiziksel özellikleri, cinsiyet, ailede veya kendisinde kanser geçmişi, çevresel faktörler gibi nedenlerle oluşabilir (Akpınar, 2006).

Aktif formu 1,25-(OH)₂D₃ olan D vitamini yapılan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda farklı kanser türlerinde hücre farklılaşmasının önlenmesinde, hücre siklusunun düzenlenmesinde, hücre proliferasyonunun inhibe edilmesinde ve apoptoziste etkileri mevcuttur (O'Kelly ve Koeffler, 2003; Van den Bemd ve Chang 2002; Değişli, 2010).

Yapılan bir çalışmada D vitamini yüksek doz takviyesinin D vitamini yetersizliği olan yaşlı kadın hastalarda serum D vitamini düzeyini artırarak, inflamasyonu baskıladığı, antioksidan kapasitesini artırdığı oksidatif stres biyomarkerlerinin artmasıyla ortaya konmuştur (Cavalcante ve ark, 2015).

Omega-3 yağ asiti kaynağı olan α -Linolenik Asit (ALA) ile yapılan çeşitli çalışmalarda prostat, meme, mesane kanser hücrelerinin proliferasyonu azaltarak regüle ettiği ortaya konmuştur. HT 29 ve HCT116 ve MCA38 hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada Omega-3 yağ asidinin hücre proliferasyonunu, adezyonunu ve invazyonunu engellediği belirlenmiştir (Chamberland JP 2014; Manson ve ark, 2012). Omega-3 yağ asitlerinin antioksidan etkileri olduğu da çeşitli deneysel çalışmalarla da gösterilmiştir (Zararsız ve ark, 2006; Kuş ve ark, 2008; Stone,1997).

Bu çalışmada Omega-3 ve D vitamininin hücre proliferasyonu, apoptoz ve antioksidan etkileri SW480 insan kolon kanser hücre dizisi kullanılarak araştırılmıştır. Bu araştırma yapılırken Omega-3 kaynağı olarak alfa-Linolenik Asit (ALA) 0,1, 0,2, 0,23, 0,25 ve 0,3 μM konsantrasyonları ve D vitamini kaynağı olarak D vitamini aktif formu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'nin 0,001, 0,005 ve 0,01 μM konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlardan oluşan α -Linolenik Asit+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ALA+D) konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrası SW480 kolon kanseri hücre dizisi üzerine etkileri elde edilen verilere göre incelenmiştir. SW480 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 testi ile hücre canlılığı hesaplanarak belirlenmiş, hücre düzeyinde apoptozis etkisi Annexin V testi ile tespit edilmiştir. Toplam protein miktarlarını belirlemek için BCA Toplam Protein testi yapılmıştır. Ayrıca antioksidan etkisi Süperoksit Dismütaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve Nitrik Oksit (NO) düzeylerinin ölçülmesi aracılığıyla belirlenmiş ve lipit peroksidasyonu ise lipit peroksidasyonu son ürünü olan Malondialdehit (MDA) düzeyleri ile tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Vücudumuzda günde yaklaşık olarak 10 000 DNA mutasyonu gerçekleşir. Tamir edilemeyen DNA hasarı sunucu oluşan bu kanserli hücreler bağışıklık sisteminin milisaniyelik taramaları sonucu yok edilmektedirler (Arpacı, 2015). Dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra insan ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan kanser, çeşitli mutasyonlar aracılığıyla hücrelerin bölünme regülasyonunun bozulması, apoptozis yeteneğinin kaybedilmesi ve replikatif ölümsüzlük yetenekler kazanması sonucunda hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlamalarıyla oluşan doku kitleleridir (Değişli, 2010, Arı ve ark, 2011).

Kanser hastalarında hastalığa bağlı malnütrisyon (yetersiz beslenme) yaşanması oranı % 40-80 aralığında olup, ayrıca tümör tipi, evre ve kanser karşıtı tedaviye de bağlıdır. Malnütrisyon, artmış morbiditeye, yaşam kalitesinin düşmesine, tedavinin etkisinin azalmasına ve artan sağlık bakım maliyetlerine neden olur. Yetersiz beslenmede uygun beslenme desteğinin erken teşhisi, beslenme durumu ve yaşam kalitesindeki gelişmeler dahil olmak üzere yararlı sonuçlara yol açabilir (Isenring, 2006).

Batı ülkelerindeki tüm kanserlerin % 30'u diyet faktörlerinin kanser sürecini etkileyebileceğini göstermiştir. Kanser sürecinde diyetle tüketilen vitaminler, tahıllar, lifler, meyveler, sebzeler, etler, yağlar, alkol ve şekerler kanserlerin ilerlemesi ve önlenmesinde etkilidir (Senatorov ve ark, 2018).

Kanser hastaları genellikle metabolik değişikliklerden muzdariptirler. Tedavi amaçlı uygulanan radyoterapi ve kemoterapide daha fazla pro-inflamatuar sitokinler, prostaglandinler ve reaktif oksijen/azot türleri üretilmektedir (Silva ve ark, 2015). Kanser tedavilerinde konvansiyonel terapilerin (gen terapisi, kemoterapi, radyoterapi gibi) yetersiz kaldığı ve insanoğlunun uygun diyet ve gıda takviyeleri ile yapılan tedavileri destekleyerek kanser sürecinde yaşam kalitesinin arttırdığı ve tedavi sürecini olumlu etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle diyetle tüketilen besinlerin ve gıda takviyelerinin, besin maddeleri ve antioksidan içerikleri açısından, sağlıklı hücrelere zarar vermeden, kanserli hücreleri yok edici etkisi olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu amaçla çeşitli besin maddeleri ve içerdikleri bir takım bileşikler veya sağlıklı yaşamın vazgeçilmez bir parçası olan vitaminlerle, esansiyel yağların

çeşitli kanser türleri üzerine yapılmış klinik çalışmalar ile *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur.

2.2. D Vitamini

D vitamini, ilk kez 1919-1920'lerde vitamin olarak sınıflandırılmıştır. Hess ve arkadaşları 1922'de ratlara güneş ışığı verildiğinde rikets hastalığının önlendiğini görmüşlerdir. 1923'te Goldblatt ve Soames, deride vitamin D'nin bir öncü maddesi olduğunu ve güneş ışığında yağda eriyen vitamin D'nin üretildiğini bulmuşlardır. 1930'larda Almanya'da yapılan bir araştırmada deride bulunan 7-dehidrokolekalsiferolün ultraviyole ışınları ile vitamin D₃'e dönüştüğünü saptamışlardır (Hochberg, 2004).

D vitamini, kalsiyum ve fosfor metabolizmasının devamlılığının sağlanmasında en önemli rolü oynayan moleküldür. Vitamin D₃ güçlü steroid hormon kalsitriolün (1,25(OH)₂D₃) öncüsüdür. Vücuttaki bir çok dokudaki genlerin ekspresyonunu regüle eder. Hormon benzeri etkilerinden dolayı, D hormonu olarak kabul edilmiştir (Feldman ve ark, 2014; Tezcan, 2012).

D vitamini klasik bir vitamin olmaktan çok, bir hormon olarak görev yapmaktadır. Çünkü D vitamini güneş ışınlarının etkisiyle ciltte üretilmektedir. Bu üretilen madde bir ön madde olup, karaciğer ve böbrekte iki defa transformasyona uğrayarak, biyolojik aktif madde şekline dönüşmektedir. Ayrıca D vitamininin aktif şeklinin kimyasal yapısı steroid hormonları ile benzerdir. D vitamini kemik, bağırsak, böbrek ve paratiroid bezler üzerine gösterdiği fizyolojik etkilerle kalsiyum ve fosfor metabolizmasını düzenlemektedir (Feldman ve ark, 2014; Jameson ve Weetman, 2004).

Steroid yapısında bir molekül olan D vitamininin aktif formu 1,25(OH)₂D₃ (1, 25 dihidroksi kolekalsiferol, kalsitriol), çekirdek reseptör gen ailesinin bir üyesi olan D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanmaktadır. Bu bağlanma sonucunda ortaya çıkan reseptör-ligand kompleksinin hücre siklüsü, hücre farklılaşması, apoptozis ve immün modülasyon üzerindeki etkilerinin saptanmasından sonra, D vitamini eksikliğinin klasik tanımlanmış kemik hastalıklarının dışında, enfeksiyonlar da dahil olmak üzere başka hastalıklarla ilişkili olabileceği belirlenmiştir. (Akkoyun ve ark, 2014; DeLuca ve ark, 1998)

1900'lü yılların başlarında raşitizm tedavisinde D vitamininin etkili olduğunun gözlenmesi ile insan sağlığı ile D vitamini arasındaki ilişki kurulmuştur. Maternal D vitamini eksikliğinin, neonatal (yenidoğan) kalsiyum metabolizmasını olumsuz etkileyerek hipokalsemi, konjenital raşitizm ve kemik kırıklarına yol açabildiği uzun süredir bilinmektedir. Son yıllarda üzerinde durulmakta olan bir başka önemli durum ise, maternal D vitamini düzeyi ile fetal ve neonatal immün sistem ve enfeksiyonlar arasındaki ilişkidir (Holick ve ark, 2008; Roachat ve ark, 2010; Chi ve ark, 2011).

Kuvvetli bir immünomodülatör olduğu bilinen D vitamininin plasental sentezinin ve etkilerinin azalması sonucunda, gebe kadınlarda farklı sistemleri ilgilendiren bir dizi problemin ortaya çıkabildiği göstermiştir. D vitamini eksikliği ile tüberküloz sıklığında artış ilk kez gösterildikten sonra D vitamini eksikliğinin enfeksiyonlarla olan ilişkisi de ortaya konulmuştur (Fischer ve ark, 2007; Bjorn ve ark, 2013).

Vücudumuzda pek çok hücrede D vitamini reseptörünün (VDR) bulunduğu gösterilmesiyle, D vitamini günümüzde etkileri hücre ve doku seviyesinde araştırılmakta olan moleküller arasında ilk sırayı almıştır (Yang ve ark, 2012; Holick, 2007).

D vitamini reseptörleri pek çok hücrede bulunmakta olup, böbrekler dışında da sentezlenebilmesi monosit ve makrofajların 1- α hidroksilaz enzimine sahip olduğunun kanıtlanmasıyla ortaya çıkmıştır. D vitamini eksikliğinin tüberkülozla ilişkisi yapılan çeşitli çalışmalarla *in vitro* olarak kanıtlanmış olup, diğer enfeksiyonlarla ilişkileri araştırılmaktadır (Davies ve ark, 1985; Di Rosa ve ark, 2011; White, 2011).

D vitamini yetersizliği genellikle güneş ışınlarından yeterince faydalanmamaktan dolayı ortaya çıkar. İleri derecede D vitamini eksikliği, mineralizasyon defektine neden olarak çocuklarda riketse, erişkinlerde ise osteomalaziyeve osteoporoza yol açar. İntestinal kalsiyum emiliminin azalması, vücuttaki kalsiyum dengesini bozarak sekonder hiperparatiroidizmle ve osteopeniyle sonuçlanır. D vitamini eksikliğinde gen ekspresyonuna dayalı olarak kanser, diyabet, multipl sklaroz gibi hastalıklara yakalanma riski artmakta olup, immün cevap yetersizliği, gebelikte düşük riskinin artışı, gebeliğin sonlanması, hipertansiyon ve depresyonda etkili olduğu ortaya konmuştur (Akkoyun ve ark, 2014; Dawson-Hughes ve ark, 1991).

D vitamininin, doğuştan immün sistem üzerine etkisi şöyle ortaya konmuştur; bakteriyel ajana karşı lizozomlarla fagozomlar 1,25(OH)₂D₃ etkisiyle birleşip, otofaji

oluştururlar. Hücre içi bakteriyel degradasyon, 1,25(OH)₂D₃-VDR kompleksinin katelisinin genini aktive etmesi sonucu artar, hücre içi bakteriyel degradasyonu hızlanır (Liu, 2011).

D vitamininin otoimmün hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, romatoid artrit, multipl skleroz, diyabet, birçok kanser çeşidi, kalp hastalıkları, osteoporoz, enfeksiyöz, hastalıklar, depresyon gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasını engellemeye veya bulguların hafiflemesine neden olduğu bildirilmektedir (Holick, 2004; 2005a; 2005b).

Vücudun D vitamini ihtiyacı büyük ölçüde güneş ışığına maruz kalmakla karşılanabilir. D vitamini çok az miktarda yumurta sarısı, yağlı balıklar ve balık karaciğeri gibi besinlerde de bulunur. D vitamini eksikliğinden korunmak için güneş ışınlarına maruz kalma yeterli gelmediğinde diyet ile destek yapılmalı, gıda takviyesi yapılarak eksiklik giderilmelidir. ABD’de önerilen D vitamini miktarları yeni doğan, çocuk ve 50 yaşına kadar olan yetişkinler için 200 IU/gün, 51-70 yaş arası yetişkinler için 400 IU/gün ve 70 yaş üzeri olan yetişkinlere 600 IU/gün’dür (Jameson ve Weetman, 2004; Vieth, 2006; Grant ve ark, 2005; Lucas ve ark, 2006).

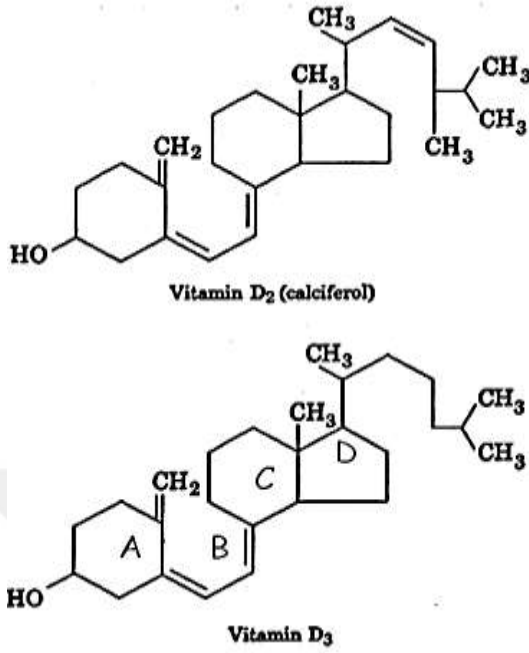
D vitamini yağda eriyen vitaminlerden olduğundan fazlası vücuttan atılmaz, oluşturduğu hiperkalsemi ölümcül olabilir. Organlarda kalsiyum birikmesine yol açar, D vitamininin fazla alımı kemiklerin kırılmasına yol açar. Fazla D vitamini kullanımı bebeklerde zihinsel ve fiziksel geriliğe, çocuklarda boyun kısa kalmasına sebep olabilir. Fazla D vitamini zehirlenmeye neden olabilir, doktor gözetiminde kullanılmalıdır (Akkoyun ve ark, 2014)

2.2.1. D Vitamininin Yapısı, Sentezi ve Metabolizması

İnsanlar D vitaminini, ya endojen olarak güneş ışığı ile temas yoluyla sentezlemekte ya da besinler ve vitamin takviyeleri ile dışarıdan almaktadırlar. En kaliteli D vitamini kaynağı olan besinler balık, süt, mantar ve yumurta gibi besinlerdir.

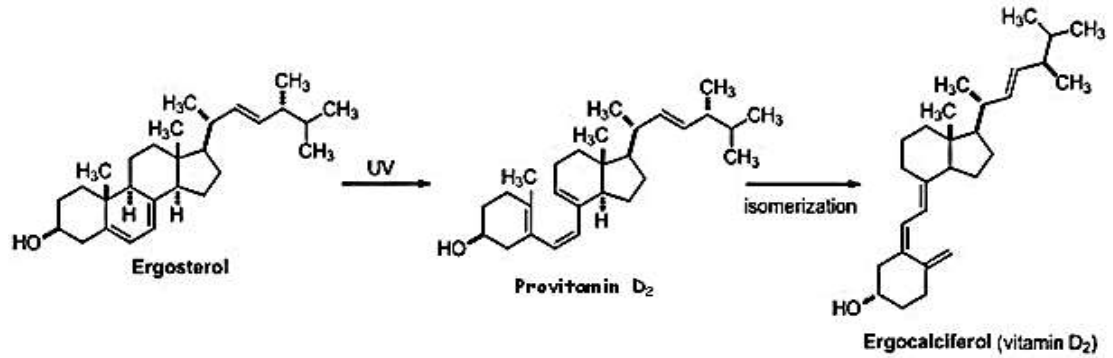
D vitamini terimi hem bitkisel kaynaklı D₂ vitamini (ergokalsiferol), hem de ultraviyole ışınlarının etkisi ile cilt altı dokularda endojen olarak sentez edilebilen D₃ vitamini (kolekalsiferol) için ortak olarak kullanılmaktadır (Akkoyun ve ark, 2014; Holick, 2007; Kimball ve ark, 2008).

Temel D vitamini formları olan D₂ ve D₃ moleküllerinin kimyasal yapısı Resim 1’de gösterilmiştir.



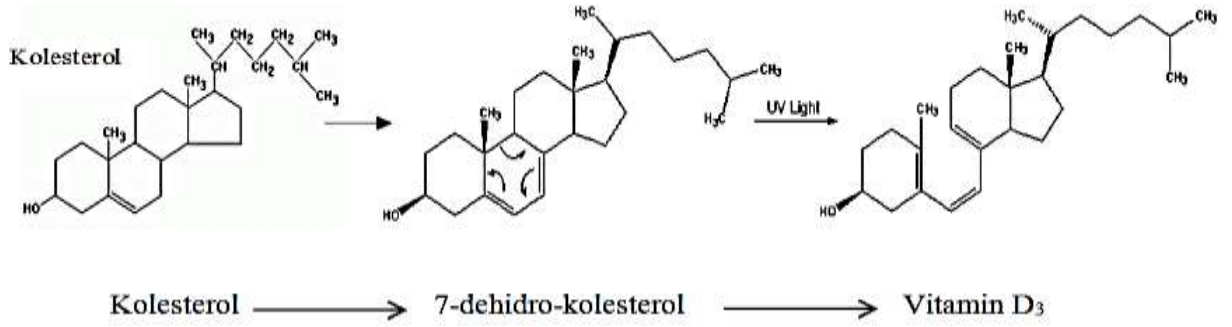
Resim 1. D₂ ve D₃ Moleküllerinin Kimyasal Yapısı (Huerta ve ark, 2002)

Ergokalsiferol [D₂ vitamini; 25(OH)D₂] bitkisel kökenli ergosterolden türemekte olup, Resim 2’de gösterilmiştir.



Resim 2. Ergosterolden D₂ Vitamini oluşumu (Akkoyun ve ark, 2014’ten değiştirilerek alınmıştır)

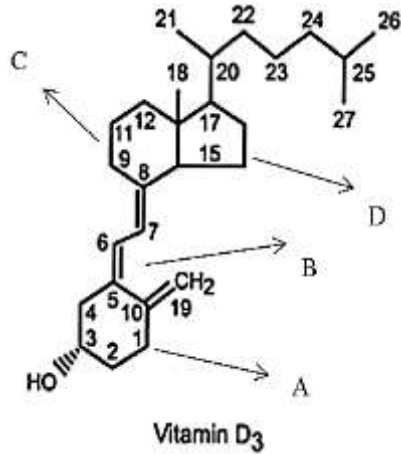
D₃ vitamini ise hayvansal kökenli deride kolesterolün oksitlenme ürünü olup 7-dehidrokolesterolden (7-DHC) türeyen kolekalsiferoldür (Resim 3) [D₃ vitamini; 25(OH)D₃] (Ward, 2005; DeLuca, 2004).



Resim 3. Kolesterolden D₃ vitamini oluşumu (Akkoyun ve ark, 2014'ten değiştirilerek alınmıştır.)

İnsan vücudunda sadece D₃ vitamini sentezlenir. Bitkisel kökenli D₂ vitamini (ergokalsiferol) morötesi ışınlar aracılığı ile yapraklarda sentezlenir. Her ikisi de hem diyetle alınır, hem de sentetik olarak üretilebilir. Hayvansal besinlerden alınan D₃ vitamini veya bitkisel besinlerden alınan D₂ vitamini incebağırsaklardan absorbe edilir ve emilimi safra asitlerinin varlığında gerçekleşir (Akkoyun ve ark, 2014).

D vitamini; dört halkadan oluşan bir sterol türevidir. Doymuş A, C, D halkaları ile 9 ile 10. karbonlar arasında açılmış, 5 ve 7. karbonlarında çift bağ içeren bir B halkası ve 8 ya da 9 karbonlu yan zincire sahiptir (Resim 4) (DeLuca, 2004; Koo ve ark, 2005).

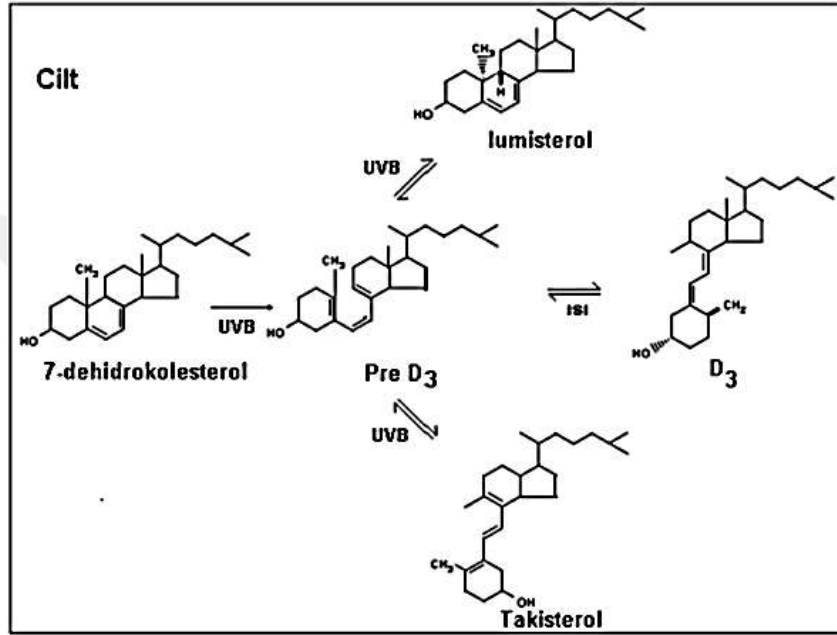


Resim 4. D₃ vitamininin kimyasal yapısı

İnsan vücudunda D vitamini sentezinin tamamı güneş ışınlarına maruz kalmak yoluyla deride 290-315 nm dalga boyundaki ultraviyole-B (UV-B) morötesi ışınlarının etkisiyle sentezlenebilir. Kolesterol karaciğerde 7-DHC'ye sentezlenerek, kan yoluyla derinin malpighi tabakasına gelir. Güneş maruziyetinde UV-B ışınları epidermisi geçerek 7-DHC'deki (inaktif

pro D₃ vitamini) çift bağlar tarafından absorbe edilir, 7-DHC, pre D₃ vitaminine ve ısının etkisiyle hızla vitamin D₃'e dönüşmektedir (Jameson ve Weetman, 2004; İlicin ve ark, 2012).

Previtamin D₃ ve vitamin D₃, UV-B ışınları tarafından inaktive edilebildiğinden, fazla güneş ışını maruziyeti ile D vitamini intoksikasyonu ortaya çıkmamaktadır. Uzun süreli güneş ışığına maruz kalma sonucu, previtamin D₃ alternatif iki inert izomer (lumisterol ve takisterol) şekline dönüşür (Resim 5).



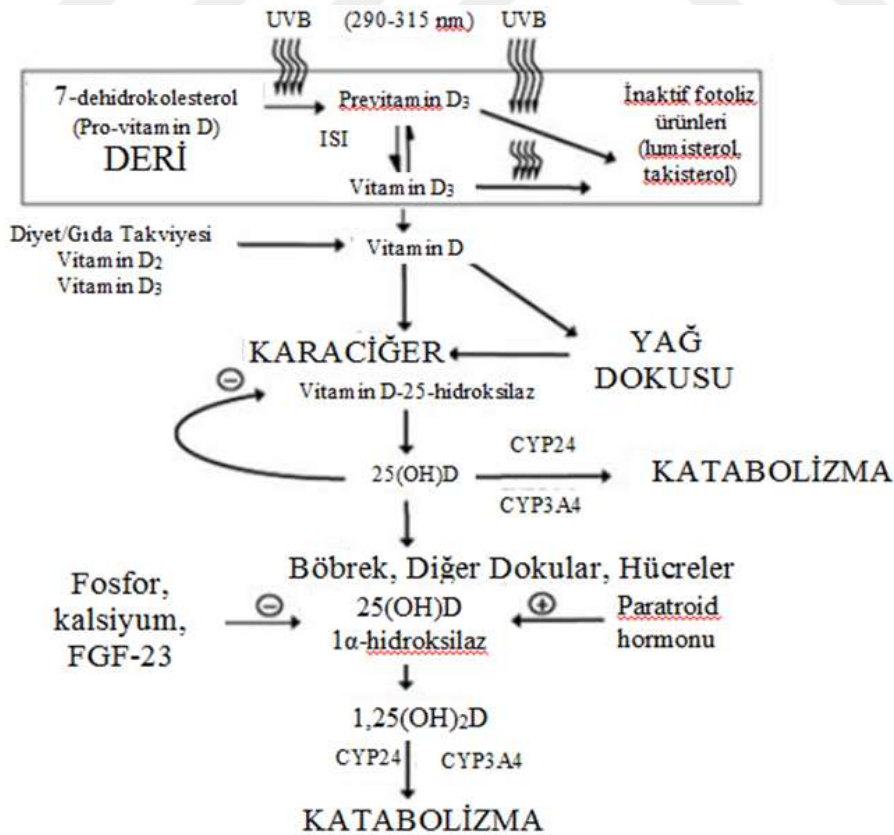
Resim 5. D₃ Vitamini Sentez Basamakları (Akkoyun ve ark, 2014'ten değiştirilerek alınmıştır.)

Bu nedenle D vitamini intoksikasyonu oluşmamaktadır. Deri hücrelerinde sentezlenen D₃ vitamini, hücre dışı alana ve oradan dermal kapiller yatağına geçer. D₃ vitamini, D vitamini bağlayıcı proteine (DBP) bağlanarak dolaşımda taşınır. İnsan organizmasında D vitamini kaynağı, %80-90 oranında bu endojen üretilmektedir (Holick, 2007; Kimball ve ark, 2008).

D₃ vitamini, DBP'ye bağlanarak dolaşımda taşınır. Sentezlenen D vitamini, 25-hidroksilaz enzimi aracılığıyla hidroksilasyona uğrayarak karaciğerde mikrozomal P-450 sisteminde 25-hidroksi vitamin D'ye (25(OH)D, kalsidiol) dönüşür. Bu molekül aynı zamanda depo formu, hem de dolaşımda en fazla bulunan metabolittir (Holick, 2007;2006).

Dolaşımda DBP'ye bağlanarak taşınan 25-OH vitamin D, böbrek proksimal tübül hücrelerinde, 1- α hidroksilaz enzimi aracılığıyla 1,25-dihidroksi vitamin D'ye ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, kalsitriol, kolekalsiferol) dönüşür. Aktif biyolojik form olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, etkisini D vitamininin hedef organları olan bağırsak, kemik, böbrek ve paratiroid bezlerinde bulunan Vitamin D Reseptörüne (VDR) bağlanarak gösterir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR kompleksi hücre çekirdeğinde bulunan retinoik asit X reseptörü (RXR) ile birleşir. Son olarak $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR kompleksi deoksiribonükleik asit (DNA) üzerinde bulunan, D vitamini cevap elemanı (vitamin D response element, VDRE) olarak bilinen bölgeye bağlanır (Fleet, 2008).

Bu bağlanma sonucunda, bağırsaklarda Ca bağlayıcı proteinlerle (calbindin) ve Ca emilimi sağlanmaktadır. Böbreklerde aktif D vitamininin ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) sentezi, serum parathormon (PTH), Ca ve P düzeylerine göre düzenlenir. 24-hidroksilaz (24-OHaz) enzimi ile D vitamini metabolitleri inaktive edilerek kalsitroik aside dönüştürülür ve vücuttan idrarla uzaklaştırılır. Hedef dokularda 24-OHaz enziminin düzeyi, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyi tarafından ayarlanır. D vitamininin metabolizmada geçirdiği bütün bu evreler Resim 6'da gösterilmiştir. (Holick, 2007; 2006)



Resim 6. D vitamini metabolizması (Özkan ve Döneray, 2011'den değiştirilerek alınmıştır.)

2.2.1.1. Parathormonun Etkisi

Serum kalsiyum düzeylerinde azalma ile birlikte serum PTH seviyesinde artış gözlenir. PTH'nin kemik metabolizması üzerine direk ve indirek etkileri mevcuttur.

PTH direk etkisini, osteoblastların aktivasyonu ve renal tübüler hücrelerde kalsiyum geri emilimi ile fosfor atılımını artırmak yolu ile kemik yapımını uyararak gerçekleştirmektedir (Kalsiyumu böbreklerden geri emdirir, kan kalsiyumu artar).

PTH'nin artmış düzeylerine günlerce devamlı olarak maruz kalınması osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunda artışa yol açması sonucunda kemikten kalsiyum ve fosfatın salınımı uyarılır. Ancak düşük dozlarda intermitant (kesintili) uygulanması osteoblast sayı ve aktivitesinde artışa neden olarak kemik mineral yoğunluğunu artırmaktadır.

PTH'nin indirek etkisi ise böbrekte 1- α hidroksilaz enzim aktivasyonu ile D vitamininin inaktif formu olan 25(OH)D, D vitamininin aktif formu olan 1,25(OH)₂D metabolitine dönüşümünü sağlayarak gösterir. Oluşan aktif D vitamini etkisi ile bağırsaktan kalsiyum geri emilimi artırılır, böylece serum kalsiyum dengesi korunur (Potts, 2005; Human ve ark, 2006; Rubin, 2002).

2.2.1.2. Kalsitonin Etkisi

PTH'nin tersi etki eder. Kemiklerde resorpsiyonu kısıtlayarak (osteoklast aktivitesini azaltır) kemik dokusundan Ca ve P kaybını önler, serum Ca ve P düzeyini azaltır. Böbreklerde Ca ve P tübüler geri emilimini azaltır.

2.2.1.3. Östrojen Etkisi

Böbreklerde D vitamini biyosentezine 1- α -hidroksilasyon aşamasında etki ederek hızlandırır. Ca'un bağırsaktan emilimini artırır. Kemik dokuda PTH'ye karşı direnç oluşturarak, serum PTH düzeyini artmasını dolaylı yoldan etkiler. PTH'nin artması böbreklerden Ca geri emilimini artırır.

2.2.2. D Vitamini ve Kanser

Kanser mortalitesinin ekvatora yaklaştıka azaldığı, güneyde yaşayanlarda kuzeyde yaşayanlara göre daha düşük olduğu, yaşanılan enlem ve kolo-rektal kanser arasında ilişki geöen yüzyılda bildirilmiştir. Kolon, prostat ve meme kanserinin UV ışınlarının bol olduğu bölgelerde daha düşük oranda görüldüğu klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Bir alışmada 25(OH)D serum düzeyi 1095 erkek olguda incelenerek, 25 nmol/L'nin üzerindeki 25(OH)D serum düzeyinin toplam kanser insidansını % 17 oranında azalttığı ortaya konulmuştur. 16.818 erişkin olgudan oluşan geniş ölçekli bir çalışmada toplam kanser mortalitesi ile D vitamini arasında bir ilişki saptanmamıştır. D vitamini serum düzeyi ve kanser sıklığı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda zayıf bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir. Yapılan alışmaların D vitamini eksikliği olan bölgelerde yapılmasıyla bu veriler ortaya konmuş olup, D vitamini düzeyinin normal olduğu bölgelerde D vitamini ve kanser insidansı arasındaki ilişki bilinmemektedir. (Özkan ve Döneray, 2011; Holick ve ark, 2008; Bikle, 2009; Misra ve ark, 2008; Weisman, 2010).

Kanser mortalitesinin güneş ışığının bol olduğu bölgelerde daha düşük olduğu bilinen bir geröektir. Güneş ışığının az olduğu bölgelerde D vitamini düzeyi düşük olduğu görülmekte olup, çeşitli kanser türlerinin görölme riski artmaktadır. Yapılan klinik çalışmaların bazılarında D vitamini ile kanser mortalitesi arasında bir ilişki saptanmamasına rağmen, oral yolla D vitamini alımı ile meme kanserinde riski düşürdüğu kanıtlanmış olsada, farklı çalışmalarda D vitamini serum düzeyi ile farklı kanser türleri arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir (Özkan ve Döneray, 2011).

Apoptozis vücudun kanserden korunma mekanizlarının en önemlilerinden biridir. Apoptozisi artıran veya azaltan besin maddeleri, gıda takviyeleri ve ilaçlar kanser mücadelesinde oldukça önemlidir. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücresele proliferasyonunun inhibisyonunda etkili olduğu bilinen 1,25(OH)₂D₃ en güçlü hormonlardan biridir (Holick 2008).

In vivo ve *in vitro* alışmalarda 1,25(OH)₂D₃ meme kanserinde anti-proliferatif etkisi ve pro-apoptotik faaliyetleri gösterilmiştir (Simboli-Campbell ve ark, 1996).

25OHD₃ serum normal düzeylerinde kolorektal kanser riskinin azaldığı gösterilmiş, erkeklerde vitamin D alımı arttıkça, kolorektal kanser riskinin azaldığı bildirilmiştir (Fescanich ve ark, 2004; Wu ve ark,2007).

Deneysel çalışmalarda hücrede D vitamini reseptörünün ve 1- α hidroksilazın kolorektal hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir. 1,25(OH)₂D₃ insan kolon adeno ve karsinoma hücrelerinden birincil kültürde oluşturulan insan kolon adenokarsinom türevli hücre hatlarında büyüme ve farklılaşmayı engellediği ortaya çıkmıştır. Aktif D vitamininin insan kolon kanseri hücresinde D vitamini reseptörlerine bağlanması ile proliferasyonu etkileyen çeşitli genleri düzenleyerek kanser hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyonu inhibe ettiği ortaya konmuştur. 1,25(OH)₂D₃ vücuttaki birçok dokudaki genlerin ekspresyonunu da regüle eder (Feldman ve ark, 2014).

Yapılan *in vivo* bir çalışmada kolon kanserinde D vitamini düzeyi yeterli ve eksik olan fareler karşılaştırılmış, D vitamini düzeyi yeterli olan farelerde tümör büyümesinin anlamlı olarak daha az olduğu gözlenmiştir (Spina, 2005).

Başka bir çalışmada toplam ve serbest 25(OH)D'nin, Afrikalı Amerikalılar arasında kolorektal kanser riski ile ters olarak ilişkili olabileceği ve Afrikalı Amerikalılarda kolorektal kanserin önlenmesinde vitamin D'nin potansiyel rolü ortaya konmuştur (Andersen ve ark, 2017).

1992 ile 2003 yılları arasında Avrupa Kanser ve Beslenme Kohortu (EPIC) tarafından yapılan bir araştırmada; 25-70 yaş arası 519 978 erkek ve kadında vaka kontrol çalışması gerçekleştirilmesi sonucunda, 713 kolon kanseri vakası tespit edilmiş olup, kolon kanserini önlemek için fiziksel aktivite ve yeterli D vitamini düzeyleri ile metabolik sağlığın korunmasının gerekliliği ortaya konmuştur (Aleksandrova ve ark, 2017).

25OHD₃ serum normal düzeylerinde, düşük düzeylere göre kolorektal kanser riskinin azaldığı gösterilmiş ve erkeklerde D vitamini alımı arttıkça, kolorektal kanser riskinin azaldığı bildirilmiştir (Fescanich ve ark, 2004; Wu ve ark,2007).

Colo201, Colo205, WiDR, Caco-2, HCT15, HT29, SW480, SK-CO-1, LS180, SW620 kolon kanseri hücre dizileri üzerinde yapılan bir çalışmada D vitamini reseptörü düzeyleri belirlenmiştir. En yüksek VDR düzeyi LS180 hücreleri için tespit edilmiş olup, SW480 ve HT29 hücre dizileri için orta düzeyde VDR tespit edilmiştir. VACO 330, SK-CO-1, VACO

235 hücreleri için VDR düzeyleri SW480'den daha yüksek iken, Colo201, Caco-2, HCT15, SW48 ve SW620 hücreleri için VDR düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Aynı çalışmada mRNA ekspresyonunda, vitamin D reseptörlerinin etkisinin VDR düzeyine bağlı olmadığı, hücre dizisine göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Shabahang ve ark, 1993). Başka bir çalışmada kalsitriol ve türevlerinin hücrede farklılaşmayı, proliferasyonu, apoptozu ve anjiyogenezi düzenlemek için VDR aracılığıyla hareket ettiği belirlenmiştir (Trump ve ark, 2010).

Kısa tek iplikli mRNA (~ 22 nükleotitli) çevirisinin regülatörü olarak işlev gören RNA'lara MikroRNA'lar (miRNA'lar) denilmektedir. miRNA'lar geniş bir biyolojik süreç dizisinde integral rollere sahiptirler (Feldman ve ark, 2014). Kalsitriolün tepki veren miRNA ile kolorektal kansere karşı koruduğu SW480-ADH, HCT116, HT29, LS174T, DLD-1, SW620, SW1417 and SW480-R hücre dizileri ile yapılan bir çalışmada tespit edilmiş olup, kalsitriolün antikanser etkisinde miRNA regülasyonunun etkili olduğu belirlenmiştir (Alvarez-Díaz ve ark, 2012).

Yapılan bir başka çalışmada Caco-2 ve SW480 hücrelerinin üzerinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün antiproliferatif etkisi olduğu belirlenmiştir. (Chen ve ark, 2002). Başka bir çalışmada SW480 hücrelerinin üzerinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün antiproliferatif ve pro-differansif etkisi olduğu tespit edilmiştir (Palmer, 2004).

Yapılan çeşitli çalışmalarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün SW480 hücreleri üzerine etki mekanizmaları ve yolları incelenmiştir (Palmer ve ark, 2001; Shah ve ark, 2006; Eelen ve ark, 2008; Godman ve ark, 2008; Kouchi ve ark, 2011). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve analoglarının SW480-ADH hücrelerinde canonical Wnt sinyalini geri çevirebildiği, β -katenin transkripsiyon aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Pendás-Franco ve ark, 2008). VDR'nin kolon kanseri hücrelerinde nükleer β -Katenin düzeyini kontrol ettiği ve bu nedenle Wnt/ β -Katenin yolağını aktive eden mutasyonların onkojenik etkisini azaltabildiği tespit edilmiştir (Larriba, 2011).

D vitamini vücutta yaygın şekilde bulunan kalsitriol ismindeki güçlü steroid hormonunun öncüsüdür. Kalsitriol kanser riskini ve prognozunu belirlemede rol oynayabilecek çeşitli hücre yolakları düzenlemesine rağmen epidemiyolojik ve erken klinik çalışmalarda ve insanlar üzerinde yapılan randomize kontrol çalışmalarında D vitamininin rolünü belirleyecek tutarlı çalışmalar, henüz mevcut değildir. Klinik öncesi ve klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, D vitamini eksikliğinin kanser gelişme riskini artırdığını

ortaya koymuştur. D vitamini takviyesi ile D vitamini eksikliğinin önlenmesi, kanser insidansını azaltmanın ekonomik ve güvenli bir yoludur (Feldman ve ark, 2014).

Caco-2, SW1417 ve SW480-ADH kolon kanseri hücrelerinde 1,25(OH)₂D₃ dozları kullanılarak yapılan bir çalışmada hücre hatlarının her biri için hücrenin fosfolipit kompozisyonunu etkileyerek hücre proliferasyonunu azaltmakta olduğu belirlenmiştir (Leysensve ark, 2015). Ancak bu konu üzerindeki çalışmalar yeterli değildir.

2.3 α-Linolenik Asit

İnsanoğunun varlığını sürdürebilmesi için en önemli yapı taşı ve enerji kaynakları olan besin ögeleri karbonhidrat, protein ve yağlardır. Yağlar birim kütlede en yüksek enerjiyi veren besin ögesi olup, ester bağı ile glicerole bağlanmış üç yağ asitinden oluşan trigliserit yapılarıdır. Yağ asitleri kompozisyonu, yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerini ve kullanım alanlarını belirlemekte olup, oda sıcaklığında katı halde olan ve karbon atomları arasında tekli kovalent bağ içeren doymuş yağ asitleri ve oda sıcaklığında sıvı halde olan ve karbon atomları arasında bir veya daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitleri olarak ikiye ayrılırlar (Karaca ve Aytaç, 2007).

Yağ asitleri hücre zarının yapı bileşenlerinden olup, glikoz yokluğunda vücuda enerji sağlayan kaynaklardır. Diyet kaynaklı çoklu doymamış yağ asitleri, memeliler tarafından sentezlenemezler ve özelleşmiş hücrelerin ve dokuların optimal biyolojik işlevi için gerekli olduklarından 'esansiyel' olarak bilinirler. Linoleik asit, liolenik asit ve araşidonik asit olarak bilinen çoklu doymamış yağ asitleri sağlığa dost bir vitamin türü olan F vitamini olarak da adlandırılırlar. F vitamini, yağda çözünebilme özelliği göstermesi nedeniyle vücut içinde depolanabilir ve düzenli olarak alınması gerekmez, fazlalığında zehirleyici etkisi olmayıp, depolanması nedeniyle kilo alımına neden olmaktadır. Tüketilen yağlardan ya da karaciğer tarafından üretilmiş olan safranin yardımı ile vücut tarafından emilmektedirler.

F vitamini cildin su tutması ve gerginliğinin korunması ile bağlantılı olduğundan eksikliğinde bir cilt hastalığı olan egzama, sivilce problemleri, cilt kuruluğu ve sağlıksız saç oluşabilecek problemlerdir. Bunlardan başka görme problemleri oluşabilir ve yaralar geç iyileşir. Doymuş yağlar, oksijen ve ısı vücuttaki F vitamininin azalmasına neden olan etkenlerdir (Nizamlıoğlu, 1998).

Son yıllarda esansiyel yağ asitlerinin kardiyovasküler rahatsızlıklar ve kanserlerdeki (meme, pankreas, kolon ve prostat kanseri) etkilerini inceleyen *in vivo* (insan hastalıklarındaki rolünü doğrudan inceleyen) ve *in vitro* (hücreSEL ortamı taklit eden) çalışmalar yapılmıştır. Esansiyel yağ asitleri hücreler üzerine doğrudan veya dolaylı olarak etki ederler. Esansiyel yağ asitleri, değişen yapısal ve fiziksel özelliklerinden ötürü, hücre membran fosfolipitlerinin bileşenleri olarak, lokal ortamda membran akışkanlığını değiştirebilir ve membran aracılığıyla yapılan işlemleri etkileyebilirler. Esansiyel yağ asitleri fosfolipidlerin yapısında yer alırlar, hücre zarının yapı taşlarıdır, sinir dokusunda miyelin tabakasının yapısında bulunurlar ve liflere yalıtım özelliği sağlayarak sinyal ve iletim işlemini hızlandırma görevi yapan sfingofosfolipitler olarak isimlendirilirler. Bunların yanında yağların taşınmasından sorumludurlar, kanın pıhtılaşmasında ve prostaglandin ve benzeri maddelerin sentezinde yer alırlar (Grammatikos ve ark, 1994).

En az üç çift bağ içeren esansiyel yağ asitleri, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynayan Eikozanoid (araşidonik asit metabolitleri) hormonlara enzimatik olarak dönüştürülebilir. Fosfolipidlerden hücrelere salınarak, hücre çoğalmasında etkili protein kinaz C'yi (C-kinaz) harekete geçirebilen alternatif habercilerdir.

Hücrelerin çoğunda hücre membranında ve endoplazmik retikulumda kalsiyum deposu olmasına rağmen hücre içi kalsiyum yoğunluğu çok düşüktür ve gerektiğinde membran ve endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} iyonları hücre sitozolüne geçerek aktive edici olarak iş görür. Kalsiyum haberci sisteminde bilginin hücre yüzeyinden hücre içine akışı, C-kinaz yolu ile diaçilgliserol ve fosfolipit varlığında gerçekleşir. Hücre için toksik bir madde olan kalsiyumun habercilik görevi, hücre içi kalsiyum miktarının artması ile başlar. Diaçilgliserol ve fosfolipit varlığında Ca^{+2} haberci sistem çalışır ve C-kinaz $Na^{+}-H^{+}$ pompasını aktive eder, H^{+} hücre dışına çıkarılır; hücre içinde pH artışı DNA sentezini başlatır, hücre çoğalır.

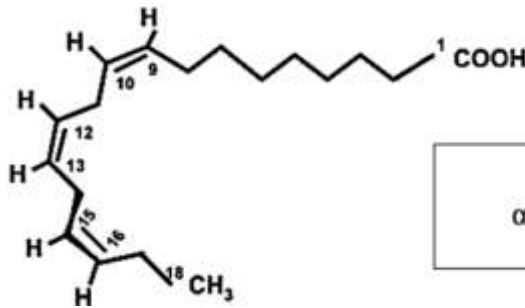
Ayrıca, oksidatif hasara duyarlılık, doymamışlık derecesiyle artar ve lipit peroksidasyonu, toksik ve mutajenik özelliklere sahip çeşitli maddelere yol açabileceğinden, dikkate alınması gereken bir komplikasyondur (Grammatikos ve ark, 1994).

Esansiyel yağ asitleri trigliserit düzeyini korur, HDL kolesterolün düşüşünü önler, insülin direncini azaltarak Tip 2 diyabetin denetiminde yardımcı olur, yüksek tansiyonun önlenmesinde, bağışıklık sisteminde, koroner arter hastalığı riskini azaltmada etkilidirler.

Omega-3 (ω -3, n-3) ve omega-6 (ω -6, n-6) yağ asitleri vücut tarafından üretilemezler, fakat vücuda girdiklerinde daha uzun zincirli yapılara dönüşüp prostaglandin gibi hormonların habercisi olan eikozanoidlerin yapı taşlarını oluştururlar. Prostaglandin-E1, damar permeabilitesini (geçirgenliği) artırır, bronkodilatasyona (bronş açılmasına), vazodilatasyona (genişlemeye) sebep olur. Trombosit kümeleşmesini ve mideden hidroklorik asit salgılanmasını önlerken, Prostaglandin-E2 Uterus kasını kontraksiyona (kasılmaya) yöneltir. Prostaglandin F2 alfa damar ve bronşlarda konstriktör (daraltma, büzme) etki gösterir ve uterus kasını uyarıcı etkisi vardır. Prostaglandin I2 ve I3 ise trombosit kümeleşmesini önlemektedir. Prostaglandinler bu etkileri dışında vücudun sıvı dengesi, sinir sisteminin çalışması, pankreastan hormon salgılanışı, lipoliz ve corpus luteum'un regresyonunda da etkin rol oynar (Fleet, 2008). Eikozanoidler hücre zarı oluşumunda, kan pıhtılaşması, yaraların iyileşmesi ve inflamasyonda görev alır (Karaca ve Aytacı, 2007).

α -Linolenik asit çoklu doymamış bir yağ asidi olup, esansiyel yağ asitlerindedir. ALA Omega-3 yağ asitlerinden olup, eikozanoid hormonlara ve prostaglandinlere dönüşebilmekte, DNA sentezi ve hücre çoğalması gibi önemli hücrel olaylarda etkili olabilmektedir.

Başlıca omega-3 yağ asitleri ise α -linolenik asit, eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asittir (DHA). Bunlar arasında DHA, beynin normal gelişimi ile göz ve sinir sisteminin gelişimini desteklerken, EPA ve DHA birlikte kalp ve damar sağlığının korunmasına yardımcı olmaktadır. α -Linolenik asit 18 karbonlu 9, 12 ve 15. karbonlarda üç adet çift bağ içeren çoklu doymamış bir yağ asididir ve Resim 7'de gösterilmiştir.



α -Linolenik Asit : 18: 3n-3 veya 18:3 Δ ^{9,12,15}

Resim 7. α -Linolenik asitin yapısı ve gösterimi

Balık yağında bulunan Eikosapentaenoik asit (EPA, 20: 5n-3) ve dokosaheksaenoik asitin (DHA, 22: 6n-3) öncüsü α -Linolenik asittir (ALA, 18: 3n-3) ve çeşitli kanser türlerinde etkilidirler (Chen ve ark, 2007; Saggar ve ark, 2010).

Yapılan bir çalışmada farelere ALA zengini bir diyet uygulanmış MCF-7 tümöründe büyüme ve çoğalmayı azalttığı gözlenmiştir (Mason-Ennis ve ark, 2016).

Birkaç meme kanseri dizisi üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda ALA, EPA ve DHA'ya dönüşmemiş, ALA'nın bağımsız etkileri görülebilmüş ve ALA'nın *in vitro* meme kanseri hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Mason-Ennis ve ark, 2016; Wiggins ve ark, 2015; Bardon ve ark, 1996; Grammatikos ve ark, 1994). Başka bir çalışmada ALA hiçbir etki göstermemiştir (Horia ve ark, 2005).

Omega-3 yağ asiti kaynağı olan ALA ile yapılan çeşitli çalışmalarda prostat, meme ve mesane kanser hücrelerinin çoğalmasını azaltarak düzenlediği ortaya konulmuştur. HT 29 ve HCT116 ve MCA 38 hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada Omega-3 yağ asidinin hücre proliferasyonunu, adezyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Chamberland, 2014).

Sıçanlar üzerinde formaldehit kullanılarak nöronal hasar ile oksidatif stres oluşturulan bir çalışmada, omega-3 yağ asiti kullanılan grupta, kullanılmayanlara göre SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri artmış ve azalan MDA seviyeleri tespit edilmiş olup, formaldehitin neden olduğu hücre hasarını azalttığı ve yapısal görünümün kontrol grubundaki sıçanlara benzediği belirlenmiştir. Prefrontal kortekste formaldehit ile indüklenen nöron hasarının omega-3 esansiyel yağ asitleri ile önlendiği saptanmıştır (Zararsız ve ark, 2006).

Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada formaldehit toksitesi sonucu testislerde meydana gelen oksidatif doku hasarının omega-3 yağ asitleri tarafından engellendiği omega-3 kullanılmayanlara göre SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri artmış ve azalan MDA seviyeleri tespit edilerek, biyokimyasal olarak ortaya konmuştur (Kuş ve ark, 2008).

Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada omega-3 yağ asiti verilen sıçanların böbrek dokusunda oksidatif hasarı önlediği, antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği ve böbrek dokusu üzerinde koruyucu etki gösterdiği, kontrol grubuna göre SOD ve GSH-Px aktivitelerinin artarken, MDA düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir (Gülçen ve ark, 2012).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda α -Linolenik asit metabolitleri olan eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asitin (DHA) antikanser ilaçlar ile birlikte kullanıldığında, kanser tedavisinde etkili olduğu, Omega-3 takviyelerinin onkoloji hastalarının iyileşmesinde etkili olduğu belirtilmiştir. Kemoterapi ve/veya radyoterapi

sırasında DHA ve/veya EPA uygulanmasını içeren 10 kontrollü klinik çalışma incelenmiş ve kemoterapi ve/veya radyoterapi sürecinde omega-3 yağ asiti takviyelerinin farklı özelliklerdeki hastalarda vücut kompozisyonunun korunmasında yararlı etkileri olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, tümör boyutunu küçültmek ve hasta sağ kalımını uzatmak gibi önemli sonuçlar elde edilmemiştir. Omega-3 kaynağı olan balık yağının antioksidatif etkileri nedeniyle kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olduğu, hücre büyümesini ve canlılığını inhibe ettiği belirtilmiştir (Silva ve ark, 2015).

Sıçanlar üzerinde balık yağı zengini ve batı yağları zengini diyetler uygulanarak yapılan bir çalışmada kolon kanserli ve normal dokulardaki etkiler prostaglandin E2 (PGE2) konsantrasyonları ile belirlenmiş olup, balık yağları kullanımının inflamasyonu düşürerek kanserden korunmada etkili olduğu tespit edilmiştir. Diyet balık yağları kolon kanseri önleme potansiyeline sahip olup, omega-3 yağ asitlerinin prostaglandinler ve diğer eikosanoidlerin oluşumunda etkili olduğu ve PGE2'nin kolon kanserinin başlaması ve ilerlemesinde oldukça etkili bir anahtar görevi gören proinflamatuvar aracı olduğu belirtilmiştir (Djuric ve ark, 2017).

Omega-3 yağ asitlerinin kanser tedavisi için potansiyel olarak yararlı olduğu tespit edilmiş olup, antitümör, anti-inflamatuvar, anti-proliferatif, pro-apoptotik, anti-invazyon, anti-metastatik ve epigenetik regülasyon özellikleri nedeniyle çoklu mekanizmalarla tümör hücre yanıtı modifiye edilebileceği belirtilmiştir (Silva ve ark, 2015).

D vitamini takviyesinin kolon kanserli kişilerde mortalite riskini azalttığı, yaşam süresini uzattığı literatürlerde bildirilmiştir. Ancak D vitamininin yüksek düzeylerde insanlara verilmesi kemik kırıkları dahil bir çok toksik etkiye yol açabilir. Bu nedenle *in vitro* çalışmalarla insan hücrelerinde hücresel düzeyde etkisinin ortaya çıkarılması önemlidir. Ayrıca *in vitro* çalışmalar için, kullanılan hücre dizisindeki D vitamini reseptörü (VDR) bulunma miktarına bağlı olarak D vitamininin etki düzeyi farklılık göstermekte olup, D vitamininin pro-apoptotik, antiproliferatif ve antioksidan etkileri olduğu literatürde bildirilmiştir. Ayrıca Omega-3 ile yapılan çeşitli çalışmalarda ise prostat, meme, mesane, kolon kanser hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve anjiyogenezini inhibe ettiği ortaya konulmuştur.

Bugüne kadar kolon kanseri hücre dizileri üzerinde yapılan çalışmalarda ALA ve D vitamininin etkileri incelenirken antiproliferatif, apoptotik etkileri ve antioksidan etkileri aynı anda değerlendirilmemiştir. Ayrıca SW480 hücre dizisi ile D vitamini ve ALA

konsantrasyonları bir arada kullanılarak yapılmış *in vitro* bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda ALA ve D vitamininin ayrı ayrı ve bir arada kullanılarak SW480 kolon kanseri hücre dizisi üzerine antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. SW480 hücre dizisi üzerinde hem ALA, hem de D vitamininin, proliferasyonu önleyici ve apoptotik etkileri ve antioksidan etkileri incelenmiştir. Bu açıdan çalışma özgün olup, bu etkilerin ortaya çıkarılmasının, ileride geliştirilecek olan tedavi stratejilerine temel oluşturması ve bilime katkı sağlanması hedeflenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarflar

Kimyasallar ve sarfların listesi Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarflar

Ürün	Ürün Kodu	Firma
RIPA Lysis tamponu, 100 ml	sc-24948	Chem Cruz
2 ml’lik steril hücre dondurma tübü	TPP89020	Thermo scientific
FBS heat inactivated, 500ml	10500064	Invitrogen Gibco
L-Glutamine 200mM 100X, 100ml	25030024	Invitrogen Gibco
Trypsin-Edta 100ml	R001100	Invitrogen Gibco
Tripan mavisi 100ml	15250061	Invitrogen Gibco
Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM) 500ml	41965039	Invitrogen Gibco
PBS 10X 500ml	70011036	Invitrogen Gibco
Penisilin Streptomisin	15140122	Invitrogen Gibco
UltraCruz™ Tissue Culture Plates, 96 well	sc-204447	Santa Cruz
UltraCruz™ Tissue Culture Plates, 24 well,	sc-204445	Santa Cruz
ExactaCruz™ Serological Pipet, 5ml	sc-200279	Santa Cruz
ExactaCruz™ Serological Pipet, 10ml	sc-200281	Santa Cruz
UltraCruz™ Flask, Tissue Culture, 75cm ²	sc-200263	Santa Cruz
UltraCruz™ Centrifuge Tube, Conical, 15ml Falcon	sc-200250	Santa Cruz
Eppendorf 1.5ml santrifüj tüpleri	sc-200271	Santa Cruz
1-200ul pipet uçları 96adet/racklı	sc-351865	Santa Cruz
100-1000 pipet uçları 60adet/racklı filtreli	sc-351863	Santa Cruz
WST1 Kiti	K304-2500	Bio Vision
1- α 25 dihidroksi vitamin D3, 50 μ g	BML-DM200-0050	Enzo
α -Linolenik Asit,500 μ g	L2376	Sigma
Annexin V Kiti	MCH100105	Muse
Smart BCA protein assay kit, 2500 test	21071	Intron
Dimetil sulfoksid(DMSO)	sc-358801	Santa Cruz
Xanthine Oxidase from bovine milk 50UN	X1875	Sigma
Glutathione Reductase from bakers yeast (S. Cerevisiae) 500UN	G3664	Sigma
β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate ~95% (HPLC), 100MG	N1630	Sigma
L-Glutathione reduced \geq 99% 5G	G6013	Sigma
Flavin Adenine Dinucleotide Disodium SIF6625-1G	F6625	Sigma
Xanthine SIX7375-10G	X7375	Sigma
Superoxide Dismutase From Bovine Liver SIS8160	S8160	Sigma
Superoxide Dismutase from Escherichia*Coli SIS5639-3KU	S5639	Sigma
Potassium Phosphate, Monobasic*Anhydrous SIP5379-100G	P5379	Sigma
Hydrogen Peroxide 30% (W/W) Solution SIH1009-500ML	H1009	Sigma
L-Glutathione Reduced Form*Crystalline SIG4251-1G	G4251	Sigma
Glutathione Oxidized, 1G SIG4376-1G	G4376	Sigma

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiştir.

- Hassas Terazî, KERN (ABJ220-4NM, Almanya)
- Saf Su cihazı, NÜVE (NS103, Türkiye)
- Buzdolabı, PROFİLO (Türkiye)
- -20°C derin dondurucu, UĞUR (Türkiye)
- -80°C, WIST (WiseCryo Simplifed Freezing System)
- İnkübatör, THERMO (Hepa Class100, Fillandiya)
- Biyogüvenlik Kabini (2.seviye), NÜVE (In 120,Türkiye)
- İnvirt Mikroskop (Olympus CK40, Tokyo, Japonya)
- UV-Visible Multiskan Spektrofotometre (Diagnostik Automation Inc, Los Angeles, ABD)
- UV-Visible Multiskan Spektrofotometre, THERMO–MULTİSKAN (FC-SN: 35700535, Fillandiya)
- Soğutmalı Santrifüj,15 ml falkon için; HETTİCH (D78532, Tuttlingen, Almanya)
- Soğutmalı Santrifüj,15 ml falkon için; HETTİCH (Rotina 38R, Tuttlingen, Almanya)
- Soğutmalı Santrifüj eppendorf için; (Eppendorf 5415R, Hamburg, Almanya)
- Soğutmalı Santrifüj eppendorf için; HETTİCH (Mikro200R, Almanya)
- Mikroplate Shaker (ısıtmalı), (Eksper HT, İzmir, Türkiye)
- Mikroplate Shaker-Isıtmalı, ALFAGEN THERMO SHAKER (TS-100C, Letonya)
- Muse™ Cell Analyzer and analysis software (Merck Millipore, Almanya).

3.3. Yöntem

Bu çalışmada kullanılan hücre dizisi SW480 adherent (yapışan) hücre tipinde olup Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Mehtap KILIÇ EREN'den temin edilmiştir. Özellikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri

ATCC® Kodu	<u>CCL-228</u>
Adı	SW480
Büyüme Özelliği	Adherent (yapışan)
Organizma	<i>Homo sapiens (insan)</i>
Morfolojisi	Epitelyal
Kaynak	Organ:Kolon Hücre Tipi: Kolon adeno karsinoma

DMEM içeren büyüme besiyeri (Complete Medium, Medium) kullanılarak hücrelerin canlılıklarını sürdürmesi sağlanmıştır. Büyüme besiyerinin içeriği aşağıda verilmiştir.

SW480 Hücreleri için Büyüme Besiyeri Hazırlanması:

%89 DMEM(Dulbecco's Modification of Eagle Medium)

% 10 FBS (Fetal Bovine Serum)

%1 penisilin streptomisin

% 0,1 siprofloksasin

Önceden dondurulmuş olup sıvı azot tankında -196 °C'de saklanan SW480 hücreleri 37 °C'deki su banyosunda dikkatlice çözülür. +4 °C'de 1100 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir. Süpernatant pipetle çekilir ve atılır. Hücre peleti üzerine 5 ml tam besiyeri eklenir ve pipetaj ile hücreler iyice süspansedilir. 50 µl alınarak ependorf tüpüne alınarak tripan mavisi ile hücreler sayılır.

1 ml'ye yaklaşık 3×10^5 hücre gelecek şekilde ekim yapılır. 37 °C'deki, nemi % 85-90 olan % 5'lik CO₂ inkübatörüne kaldırılır. Hücrelerin canlılığı ertesi gün invert mikroskop

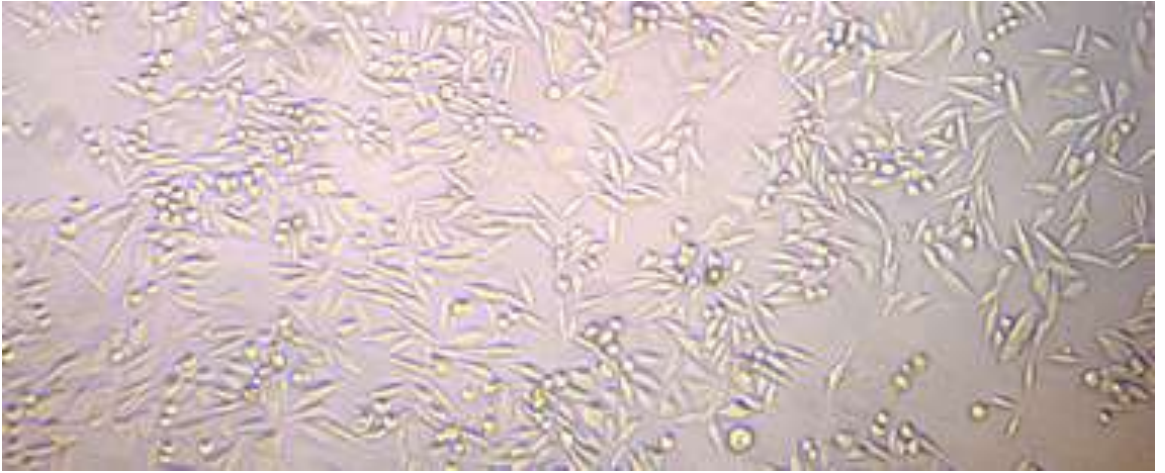
altında bakılarak kontrol edilir. SW480 hücreleri adherent yapıda hücreler olduğundan canlı hücreler Resim 8’de görüldüğü gibi flask tabanına tutunmuş durumdadırlar.



Resim 8. Adherent yapıdaki SW480 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü

3.3.1. Hücrelerin Pasajlanması

Flask doluluk oranı % 80-90 aralığına ulaştığı zaman (Resim 9) pasajlama işlemi gerçekleştirilir.



Resim 9. Doluluk oranı %80-90 aralığına ulaşmış flastaki SW480 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü

% 5 CO₂'li inkübatörden çıkarılan hücre kültürü flastı invert mikroskopta kontrol edilerek biyolojik güvenlik kabinine alınır. Eski medium aspire edilerek atılır, PBS

(phosphate buffered saline) tampon ile yıkama yapılarak aspire edilir. Hücreleri flasktan kaldırmak için 1-1,5 ml % 0,25'lik tripsin-EDTA (tripsin) solüsyonundan eklenir. 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde birkaç dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra invert mikroskopta görüntüsüne bakılır (Resim 10), kabine alınarak tripsin uzaklaştırılır.

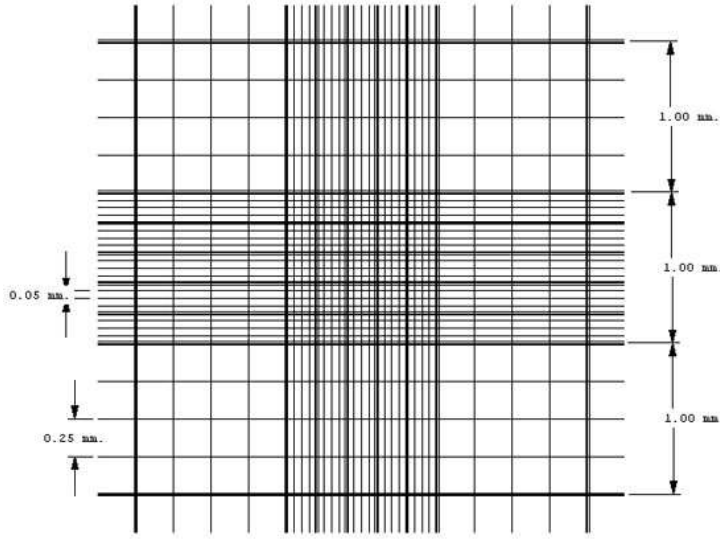


Resim 10. SW480 hücrelerinin tripsinle muamele sonrası invert mikroskop görüntüsü

Eklenen tripsinin 5 katı kadar medium eklenerek tripsinin etkisi inhibe edilir ve pipetaj yapılarak hücreler kaldırılır. 50 µl besiyeri ependorf tüpüne alınır, tripan mavisi ile 1:1 dilue edilir. Thoma lamına 10 µl alınarak ve hücreler sayılır. Hücre sayısı dikkate alınarak pasaj miktarı belirlenir. SW480 hücreleri genellikle 1:3 pasaj yapılır, 37 °C'de, % 5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılır.

3.3.2. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü

Her Pasaj ve dondurma işleminde hücre sayısı ve canlılığı tripan mavisi ile invert mikroskopta kontrol edilir. 50 µl tripsinle kaldırılmış hücre mediumu ependorf tüpüne alınarak tripan mavisi ile 1:1 (dilüsyon faktörü) dilue edilir (dilüsyon faktörü hücre çokluğuna göre değişebilir). 10'ar µl alınarak thoma lamına (Resim 11) pipetlenir ve hücreler sayılır, ortalama canlı hücre sayısı belirlenir.



Resim 11. Hücre sayımı için kullanılan toma lamı görüntüsü

Hücre sayısı 1 nolu eşitlikle hesaplanır;

$$\text{Hücre Sayısı} = H_s \cdot DF \cdot 10^4 \cdot V \quad (1)$$

H_s :Ortalama Sayılan Canlı Hücre Sayısı

DF :Dilüsyon Faktörü

V : Sayılan hücrenin bulunduğu besiyeri hacmi

Hesaplama sonucuna göre 1 ml'ye yaklaşık 3×10^5 hücre gelecek şekilde ekim yapılmalıdır.

3.3.3. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler pasajlanırken, bir kısım hücreler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurularak saklanır. Doluluk oranı % 80-90 aralığına ulaşan % 5 CO₂'li inkübatörden çıkarılan flask invert mikroskopta kontrol edilerek biyolojik güvenlik kabinine alınır. Eski medium aspire edilerek atılır, PBS ile yıkama yapılarak aspire edilir. Hücreleri flasktan kaldırmak için % 0,25'lik tripsin-EDTA solüsyonundan eklenir. Flasktan kalkana kadar 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde bekletilir. Eklenen tripsinin 5 katı kadar medium eklenerek tripsinin etkisi inhibe edilir ve pipetaj yapılarak yapışan durumdaki hücrelerde kaldırılır. 15 ml'lik konik tabanlı steril falkona aktarılır. +4 °C'de 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.

Kabine alınarak süpernatant aspire edilir. 1-1,5 ml dondurma besiyeri ilave edilir ve pipetaj yapılarak hücreler süspanse edilir.

50 µl dondurma besiyeri ependorf tüpüne alınır, tripan mavisi ile 1:1 (dilüsyon faktörü) dilue edilir. 10 µl alınarak thoma lamına pipetlenir ve hücreler sayılarak canlılık kontrolü yapılır. Hücrenin adı, pasaj sayısı, canlı hücre sayısı, dondurma tarihi gibi bilgiler not edilerek, hücreler dondurma tüpüne konur ve -80 °C'ye konur. Burada 1 ay muhafaza edilebilir. Daha sonra sıvı azot tanklarına (-196 °C'de) aktarılarak muhafaza edilmesi gerekir.

3.3.3.1. SW480 Hücreleri için Dondurma Besiyeri Hazırlanması

% 70 DMEM,

%20 FBS,

%10 DMSO (dimetilsülfoksit) reaktifleri karıştırılarak hazırlanır.

3.3.4. Hücre Kültürü Uygulaması

-196 °C'de sıvı azot tanklarında saklanan SW480 hücreleri çözülüp, hücre sayısına göre uygun büyüklükte ve sayıda flaska aktarıldı. % 80-90 doluluğa ulaştığında, pasajlanarak, 75'lik büyük flaslara aktarıldı. Uygulayacağımız analizler için hücrelerin sağlıklı olup olmadığı pasajların % 80-90 doluluğa ulaşması ve hücrelerin canlılık oranları günlük takip edilerek invert mikroskopta kontrol edildi.

3.3.4.1. WST-1 Analizi için Hücre Kültürü Çalışması

Flasklar dolduğunda WST-1 analizi için 96 kuyucuklu plaklarda hücre sayısı kontrolü yapıldı. Bu işlemde kuyucuk başına 100 µl'de ve 200 µl'de 5×10^3 , 6×10^3 ve 7×10^3 hücre olacak şekilde 3'er tekrarlı ekim yapıldı ve 5 gün süreyle invert mikroskopta kontrol edilerek hücre proliferasyonu takip edildi. Burada besiyerinin yeterli gelmesi ve kuyucuklarda hücrelerin proliferasyonunun ekim, ilaç ekimi ve ilaç etkisinin 72 saat boyunca sağlıklı bir şekilde gözlenebilmesi için ekilecek hücre sayısı belirlenmiş oldu. Yapılan gözlemler sonucunda 96 kuyucuklu plak için hücre sayısı 100 µl hacim için 7×10^3 olarak belirlendi.

D vitamini DMSO'da, ALA etanolde çözüldü. Çözme işleminden sonraki bütün seyreltmelerde büyüme besiyeri kullanıldı. Daha sonra literatür taraması yapılarak D vitamini için 7 farklı konsantrasyonda ve ALA için 8 farklı konsantrasyonda hücrelerin canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkileri WST-1 testi ile ölçüldü. Bu konsantrasyonlar;

D vitamini için, 1, 0,1, 0,05, 0,025, 0,01, 0,005, 0,001 μM olup, bu konsantrasyonlar için WST-1 denemesi yapıldığında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası % Canlılık belirlendi. Çalışmada uygulanan maksimum inkübasyon süresi olan 72 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenen % Canlılık % 62,9-88,5 aralığında olup, toksik konsantrasyonlar olan 1, 0,1 ve 0,05 konsantrasyonları dahil olmak üzere IC_{50} konsantrasyonu tespit edilmemiştir. Sonuçlar dikkate alınarak D vitamini konsantrasyonları 0,001, 0,005 ve 0,01 μM olarak belirlendi. DMSO çözücüsünün D vitamini konsantrasyonlarındaki maksimum miktarı % 1 olduğu hesaplandı.

ALA için, 1, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 μM olup, bu konsantrasyonlar için WST-1 denemesi yapıldığında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası % Canlılık belirlendi. Çalışmada uygulanan maksimum inkübasyon süresi olan 72 saatlik inkübasyon sonrasında 0,2 μM konsantrasyonu için hücrelerde değişiklik gözlenmemesi ve % Canlılığın ETANOL kontrol grubu ile aynı kalması ve 0,3 μM konsantrasyonu için hücrelerin tamamen ölmesi ve % Canlılığın % 24 bulunması nedeniyle 0,23 μM ve 0,25 μM konsantrasyonları eklenerek 0,1, 0,2, 0,23, 0,25 ve 0,3 μM olmak üzere 5 konsantrasyon belirlendi. D vitamini ve ALA'nın birlikte olan konsantrasyonları matriks şeklinde 15 ayrı konsantrasyon olarak belirlendi. 100 μl 'lik medium için 10 μL ilaç ekimi yapılarak ve WST-1 analizi 3 kere tekrar edildi. ETANOL çözücüsünün ALA konsantrasyonlarındaki maksimum miktarı % 3 olarak hesaplandı.

3.3.4.2. BCA Protein, Annexin V, GPx, SOD, NO ve MDA Analizleri için Hücre Kültürü Çalışması

BCA Protein, Annexin V (Annexin V için sadece ölüm olduğu konsantrasyonlar çalışıldı.), GPx, SOD, NO ve MDA analizleri için 24 kuyucuklu plaklara 500 μl hacim için $2,8 \times 10^4$ hücre olarak ekim yapılarak hücre kültürü çalışması uygulandı. 500 μl 'lik medium için 50 μL ilaç ekimi yapıldı. Annexin V analizi için hücrelerin kaldırılması işlemi tripsin ile

BCA Protein, GPx, SOD, NO ve MDA analizleri için hücrelerin kazınması işlemi için ripa çözeltisi ile yapılarak farklı işlemler uygulandı.

3.3.4.2.1. BCA Protein, GPx, SOD, NO ve MDA Analizleri için Lizat Eldesi

BCA toplam Protein, GPx, SOD, NO ve MDA analizleri için 72 saat için ayrı ayrı kültüre edilip ilaç ekimi yapıldı. 72. saat dolduğunda aşağıdaki işlemler uygulandı.

Kuyucuklardan medium aspire edildi, 300 µl PBS ile yıkandı. 50 µl ripa eklendi. 24 kuyucuklu plak buz kalıbı üzerine konularak ripanın etkili olması sağlandı. Hücreler kazındı ve ependorflara alındı. Bu işlemler yapılırken ependorfların soğuk olması için ependorflar kendileri için hazırlanmış buz kalıpları içinde tutuldu. Karışması için ependorfların dipleri hızlı bir şekilde 3-4 kere pipet stantlarına sürtüldü ve hızlı bir şekilde çalkalayıcıya yerleştirildi ve +4°C'de, 450 rpm'de 40 dakika çalkalandı. +4°C'de, 13 000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Lizat alınarak ependorflara konuldu. -20 °C'ye kaldırıldı. Bu işlemlerden sonra BCA protein, GPx, SOD, NO ve MDA analizlerinden her biri için kendi protokolü uygulandı.

3.3.5. Analizler

3.3.5.1. WST-1 Testi

WST-1 testi hücre canlılığı ve sitotoksik etki belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimleri ile tetrazolium tuzlarının ayrışarak formazona dönüşmesi esasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik ve kolorimetrik bir testtir. Dolayısıyla canlı hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitesinin artmasına yol açar. 450 nm dalga boyunda, referans dalga boyu 620 nm alınarak metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından üretilen formazon boya hücreleri boyamakta olup, spektrofotometrede boyanan hücrelerin absorbanası ölçülmektedir (Doyle ve Griffiths, 1998).

Yapılan bu test ile SW480 hücreleri üzerine eklenen D, ALA+D ve ALA konsantrasyonları için % Canlılık hesaplanarak, sitotoksik etkisinin olup olmadığı belirlendi.

Çalışmada kullanılan D vitamini, ALA ve D+ALA konsantrasyonları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. D vitamini, ALA ve D vitamini+ALA konsantrasyonları

Medium	Besiyeri
Hücre+ Medium	Kontrol
D Vitamini Çözücüsü	DMSO
D Vitamini Dozları(µM)	0,001
	0,005
	0,01
D Vitamini Çözücüsü + ALA Çözücüsü	DMSO+ETANOL
ALA+D Vitamini Konsantrasyonları (µM ALA-µM D)	0,1-0,001
	0,1-0,005
	0,1-0,01
	0,2-0,001
	0,2-0,005
	0,2-0,01
	0,23-0,001
	0,23-0,005
	0,23-0,01
	0,25-0,001
	0,25-0,005
	0,25-0,01
	0,3-0,001
0,3-0,005	
0,3-0,01	
ALA Çözücüsü	ETANOL
ALA Konsantrasyonları(µM)	0,1
	0,2
	0,23
	0,25
	0,3

96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 7×10^3 hücre olacak şekilde toplam hacmi 100 µl olan hücre süspansiyonu eklendi. 24, 48, 72 saat için ayrı plaklar kullanıldı.

Hücreler 37° C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra plakların invert mikroskopta kontrolleri yapıldı. 24, 48 ve 72 saatlik plaklara her konsantrasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde Tablo 3'teki ilaç konsantrasyonları her kuyucuğa 10 µL olarak eklendi. 24 saat sonra tüm plaklar invert mikroskopta kontrol edilerek 48. ve 72. saat plakları tekrar inkübatöre kaldırıldı. 24. saat plağı her kuyucuğuna 10 µl WST-1 reagent eklenerek, 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometrede 450 nm'de, referans dalga boyu 620 nm alınarak ölçüm yapıldı. Aynı işlemler 48. saat ve 72. saatlerde 48 ve 72. saatlik plaklara uygulandı.

Yapılan WST-1 testi 3 kere tekrar edildi. WST-1 sonuçları 2 nolu eşitlik yardımıyla olarak hesaplandı. Elde edilen veriler Excel programında grafik haline getirilerek ve SPSS 18 ile

istatistik olarak değerlendirildi. 3 nolu eşitlikte belirtilen sitotoksik etki ile Canlılık arasındaki ilişki ifade edildi.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{A}{A_{\text{Kontrol}}} \cdot 100 \quad (2)$$

A: Eklenen Konsantrasyon grubunun absorbands değeri

A_{kontrol} : Kontrol grubunun absorbands değeri

$$\% \text{ Sitotoksik etki} = 100 - \% \text{ Canlılık} \quad (3)$$

3.3.5.2. BCA Total Protein Tayini

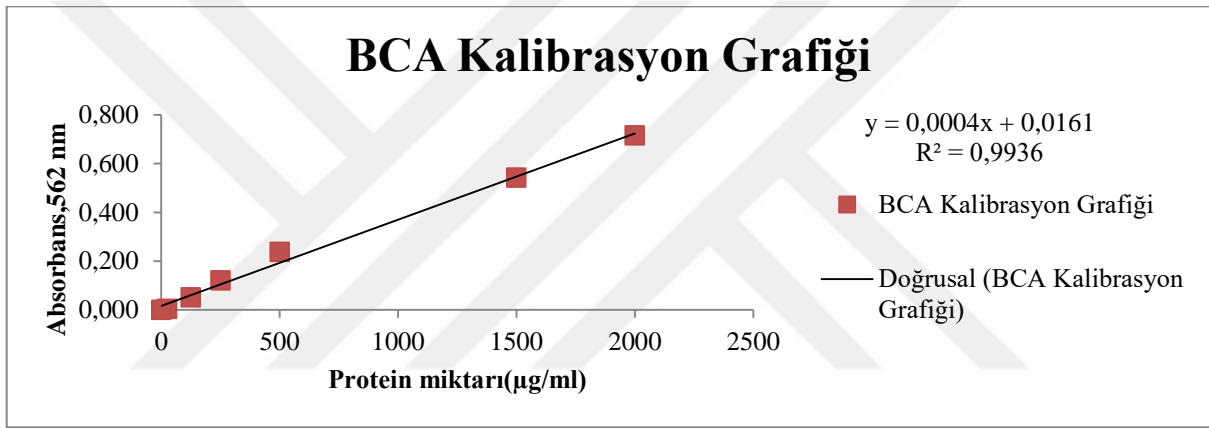
Total protein Tayinini Smart BCA Protein Assay Kit (Intron, Gyeonggi, G.Kore) kullanarak kolorimetrik yöntem ile yapılması esasına dayanır. Toplam proteinin belirlenmesi için bicinchoninic asit (BCA) yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak tespit edilmiştir (Smith ve ark, 1985). İki BCA molekülü ile bir bakır iyonu şelatlanarak mor renkli reaksiyon ürününü oluşturulmuştur. Bu suda çözünür kompleks 562 nm'de 20-2000 µg/ml BSA çalışma aralığında doğrusaldır.

BCA ile renk oluşumunun 3 nedeni vardır. Bunlar proteinin makromoleküler yapısı, peptit bağlarının sayısı ve dört belirli amino asit olan sistein, sistin, triptofan ve tirozin olarak belirlenmiştir. Buna göre, sığır serum albümini (BSA) gibi ortak bir proteinin standartları kullanılarak protein konsantrasyonları belirlenmektedir. Bilinen konsantrasyondaki bir dizi dilüsyon BSA proteinden hazırlanır ve bilinmeyen örnek konsantrasyonlarının standart grafiğine göre belirlenmesi prensibinden yararlanır.

3.3.5.2.1. BCA Protokolü

- BSA (Bovine serum albümin: Sığır serum albumini) Protein standartları hazırlandı.
- Hazırlanan Protein standartları ve -20 °C'den çıkarılan lizatlardan (Bölüm 3.3.4.2.'deki ön işlem uygulanarak liziz edilmiş örnekler) 25'er µl alınarak, 96 kuyucuklu plaka pipetlendi.

- 200 µl çalışma solüsyonu (WS: working solution) eklenerek, 30 saniye çalkalayıcıda çalkalandı.
- Plak kapağı kapatılarak 30 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Oda koşullarına soğutuldu.
- Standartlar ve örneklerde mor renk oluşumu gözlenmeye başladıktan sonra 562 nm’de okuma yapılır.
- SW480 hücrelerine D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarındaki protein miktarı Smart BCA protein assay kit kullanılarak çizilen BSA standart grafiği (Şekil 1) denklemine göre hesaplandı. Sonuçlar µg/ml şeklinde verildi. Elde edilen veriler Excel programında grafik haline getirilerek ve SPSS 18 ile istatistik olarak değerlendirildi.



Şekil 1. BCA kalibrasyon grafiği

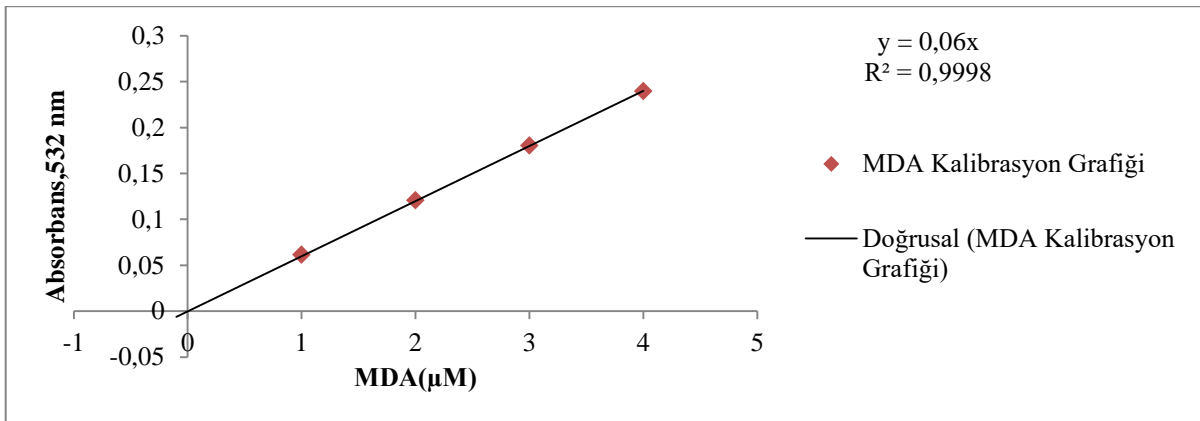
3.3.5.3. MDA Tayini

MDA lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan en önemli parametre olup, oksidatif stresin indirek ürünüdür. MDA, tiobarbitürik asit (TBA) reaktif maddeleri açısından oksidatif stres dolaylı bir belirteci olarak spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda ölçülür (Şen ve ark, 2006). MDA, aerobik şartlarda, pH 3,4’te TBA ile 95°C’de 30 dakika inkübe edilirse pembe renkli bir kompleks oluşturur (Ohkawa ve ark, 1979).

SW480 hücrelerine D, ALA+D ve ALA konsantrasyonları uygulanması sonucu malondialdehit konsantrasyonları TBARS (tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren ürünler) ölçümü yapılarak indirekt olarak değerlendirildi. -20 °C’den çıkarılan lizatların MDA düzeyi ölçümü yapıldı.

3.3.5.3.1. MDA Protokolü

- 50 µl lizat (bölüm 3.3.4.2.'deki ön işlem uygulanarak liziz edilmiş örnek) alındı.
- 500 µl %20'lik trikloroasetik asit (TCA) eklendi.
- 200 µl %0,67'lik TBA eklendi ve karıştırıldı.
- Karışım 95 °C'de 30 dakika kaynatıldı.
- Buz üzerine konularak hızlı bir şekilde soğutuldu.
- Karışım vortekslendi ve 800 µl n-bütanol ilave edildi.
- +4 °C'de 3250 rpm'de 7 dakika santrifüjlendi.
- 150µl süpernatant 96 kuyucuklu plaka pipetlendi.
- UV-Visible Multiskan Spektrofotometrede (Diagnostik Automation Inc, Los Angeles, ABD) 532 nm'de köre karşı ölçüm yapıldı.
- Sonuçlar MDA-Absorbans grafiğinin denklemi (Şekil 2) kullanılarak µM hesaplandı ve toplam proteine bölünerek MDA aktivitesi belirlendi.
- Elde edilen veriler Excel programında grafik haline getirilerek ve SPSS 18 ile istatistik olarak değerlendirildi.



Şekil 2. MDA kalibrasyon grafiği

3.3.5.4. NO Tayini

Genel aracı bir molekül olan Nitrik oksit (NO) organizmanın bir çok işlevinde ve bir çok hastalık durumunda rol alır. Hemen hemen her hücre tarafından üretilir ve her hücre üzerine etkinlik gösterir. Bu nedenle, diğer serbest oksijen radikaller her konsantrasyonda zararlı iken, NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynar. Ancak, uygunsuz yerde ve aşırı miktarda üretildiğinde, bir çok patolojik durumun ortaya çıkmasına neden olur.

3.3.5.4.1. Kimyasal Hazırlama

- Glisin tampon: 15 g glisin deiyonize su ile çözünür. NaOH çözeltisi ile pH:9,7'ye ayarlanır. 1 L'ye tamamlanır.
- 3 M HCl: Önce biraz saf su konarak, 124,5 ml HCl yavaşça eklenir, 500 ml saf su ile tamamlanır.
- Sülfanilamid: 5 g sülfanilamid 500ml 3 M HCl içinde çözünür. Soğutulur.
- N-(1-Naphthyl)ethylene-diaminedihydrochloride (NNDA): 50 mg NNDA deiyonize suda çözünür ve 250 ml'ye tamamlanır.
- 75 mM ZnSO₄ :12,1103g ZnSO₄ saf suda çözünür ve 1L'ye saf su ile tamamlanır.
- 55 mM NaOH :2,2g NaOH saf suda çözünür ve 1L'ye saf su ile tamamlanır.
- 10 mM Na₂B₄O₇: 3,8137 g Na₂B₄O₇·10H₂O saf suda çözünür, 1 Lye tamamlanır.
- 0,1M NaNO₂ standartı: Saf su yerine 10 mM Na₂B₄O₇ çözeltisi kullanılır. 6,8995 g NaNO₂10 mM Na₂B₄O₇'ta çözünür ve 1 L'ye 10 mM Na₂B₄O₇ çözeltisi ile tamamlanır.
- 5mM CuSO₄: 0,798 g CuSO₄ saf suda çözünür ve 1L'ye saf su ile tamamlanır.
- Kadmiyum granüllerinin (0,1M H₂SO₄ içinde saklanır.) yıkanması: deiyonize su ile yıkanır. 5 mM/L'lik CuSO₄'te 1-2 dakika bekletilir, çözelti dökülür. Granüller Glisin tamponu ile yıkanarak deneye hazır hale gelir.

3.3.5.4.2. NO Protokolü

- 50 µl lizat (bölüm 3.3.4.2.'deki ön işlem uygulanarak liziz edilmiş örnek) ependorf tüpüne alındı.
- 100 µl 75 mM ZnSO₄ eklendi.
- 200 µl 55 mM NaOH eklendi.
- +4 °C'de 3500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
- 100 µl süpernatant, glisin tamponu ile yıkanmış kadmiyum granülleri ve 100 µl glisin tamponu bulunan ependof tüpüne alındı.
- 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 100µl'lik örnekler 96 kuyucuklu plak kuyucuğuna alındı.
- 50 µl Sülfanilamid eklendi.
- 50 µl NNDA eklendi.
- 545 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

Bulunan NO değerleri Toplam Protein miktarına bölünerek NO aktivitesi hesaplandı. Elde edilen veriler Excel programında grafik haline getirilerek ve SPSS 18 ile istatistik olarak değerlendirildi.

3.3.5.5. GSH-Px (GPx) Tayini

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GSH-R) Gerek hidrojen peroksiti (H₂O₂) ve gerekse LOOH'leri (lipit hidroperoksit) metabolize eden antioksidan enzimdir.

3.3.5.5.1. Kimyasal Hazırlama

- Tampon (75 mmol/L, pH:7,0) : 0,5324 g Na_2HPO_4 ($m_A=141,96$ g/mol, pH~11) ve 0,5104 g KH_2PO_4 ($m_A=136,09$ g/mol, pH~5) saf su ile çözünür ve 50 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- GSH, Redükte (Redükte glutatyon, 60 mmol/L, $m_A=307,3$ g/mol): 0,461g GSH saf su ile çözünür ve 25 ml'ye saf su ile tamamlanır (+4°C'de saklanır).
- EDTA disodyum tuzu (15 mmol/L, $m_A=372,2$ g/mol): 0,279 g disodyum-EDTA saf su ile çözünür ve 50 ml'ye saf su ile tamamlanır (+4°C'de saklanır).
- NADPH (3 mmol/L, $m_A=833,3$ g/mol): 0,003 g NADPH saf su ile çözünür ve 100 μl 'ye saf su ilave edilir (Taze hazırlanır).
- GR (Glutatyon redüktaz, 30 U/ml): 120 μL GR(500 U/20 ml) 880 μL saf su ile tamamlanır.
- H_2O_2 (7,5 mmol/L, $m_A=34,01$ g/mol, d:1,13g/ml): 22 μl H_2O_2 ve 25 ml saf su ilave edilir (Taze hazırlanır).
- GPx reagent: 90 örnek için örnek başına; 500 μl Tampon, 12,5 μl GSH (redükte), 25 μl disodyum-EDTA, 25 μl NADPH ve 25 μl GR olacak şekilde karışım hazırlandı.

3.3.5.5.2. GSH-Px Protokolü

- Önceden hazırlanmış olan 50 μl hücre lizatı (Bölüm 3.3.4.2.'deki ön işlem uygulanarak liziz edilmiş örnek) 163 μl 'ye saf su ile seyreltildi.
- 587,5 μl GPx reagent ilave edildi.
- Semi mikro küvete konularak 37°C'de 340 nm'de ilk ölçüm yapıldı.
- 25 μl H_2O_2 ilave edilerek 30 saniyede bir ölçüm yapılarak 3 dakika süresince NADPH'ın kayboluşu izlendi.

- 3 dakika içindeki absorbans farkının en fazla olduğu 30 saniyedeki absorbans farkları belirlenerek, 4 nolu eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$GPx = \frac{\Delta A \cdot 10^6 \cdot V_{toplam}}{\epsilon \cdot L \cdot T \cdot V_{örnek}} \quad (4)$$

GPx : mU/ml

ΔA : absorbans değişimi (0-3 dk içerisinde en fazla absorbans farkının tespit edildiği 30 s)

T: zaman (30'')

V_{toplam} : Toplam hacim

$V_{örnek}$: Örnek hacmi

L: 10^3

ϵ : $6,22 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (extinction sabiti)

4 nolu eşitlikte T, V_{toplam} , $V_{örnek}$, L ve ϵ değerleri yerine konularak hesaplama yapılırsa 30 saniye için 4 nolu eşitlik 5 nolu eşitliğe dönüşür.

$$GPx = 4823 \cdot \Delta A \quad (5)$$

($V_{örnek}$: 50 μl , 163 μl 'ye ultra saf su ile seyreltilmiş, 30 saniye için)

Bulunan GPx değerleri Toplam Protein miktarına bölünerek GPx aktivitesi hesaplandı. Elde edilen veriler Excel programında grafik haline getirilerek ve SPSS 18 ile istatistik olarak değerlendirildi.

3.3.5.6. SOD Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.

3.3.5.6.1. Kimyasal Hazırlama

- EDTA disodyum tuzu (0,6 mmol/L, $m_A=372,2$ g/mol): 0,0112 g disodyum-EDTA saf su ile çözünür ve 50 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- Xantine (0,3 mmol/L, $m_A=152,1$ g/mol): 0,023 g xantine 5 ml 0,1 N NaOH ile çözünür ve 50 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- NBT (Nitroblue tetrazolium çözeltisi, 150 μ mol/L, $m_A=817,6$ g/mol): 0,0031g NBT saf su ile çözünür ve 25 ml'ye saf su ile tamamlanır (Taze hazırlanır).
- Na_2CO_3 (400 mmol/L, $m_A=105,93$ g/mol): 2,1186 g Na_2CO_3 saf su ile çözünür ve 50 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- CuCl_2 (0,8 mmol/L, $m_A=170,48$ g/mol): 0,0068 g CuCl_2 saf su ile çözünür ve 50 ml'ye deiyonize su ile tamamlanır.
- BSA (Sığır serum albimini, 1mg/mL): 0,05 g BSA saf su ile çözünür ve 50 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Amonyum sülfat, 2 mol/L, $m_A=132,1$ g/mol): 2,64 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saf suda çözünür ve 10 ml saf su ile tamamlanır.
- XOD (0,857 U/ml)Solüsyonu hazırlanması: 132 μ l XOD çözeltisi (0,4U/mg protein, 16,2 mg protein/ml), 868 μ l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 mol/L) çözeltisi ile tamamlanır.
- SOD reaktifi: 40 örnek için taze hazırlanır. 10 ml Xantine, 5 ml disodyum-EDTA, 5 ml NBT, 3 ml Na_2CO_3 , 1,5 ml BSA ile hazırlanır (Taze hazırlanır).

3.3.5.6.2. Lizatın Hazırlanması

- 20 μ l lizat (Bölüm 3.3.4.2.'deki ön işlem uygulanarak liziz edilmiş örnek) alındı.
- 480 μ l saf su ilave edildi.
- 250 μ l etanol, 150 μ l kloroform ilave edildi. Vortekslendi.

- +4 °C'de 12 000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Örnek SOD protokolü için hazır hale geldi.

3.3.5.6.3. SOD Protokolü

- 100 µl örnek ependorf tüpüne alındı.
- 490 µl SOD reaktifi eklendi.
- 40 örnek için sıra ile 30 saniye ara ile 10 µl XOD solüsyonu eklendi. Böylece her numune için 20 dakika beklenmiş oldu.
- XOD eklemesi bitince 200 µl CuCl₂ eklendi ve 15 saniye içinde 560 nm'de spektrofotometrede okutuldu.
- 6 nolu eşitlik kullanılarak % inhibisyon (%İ) değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}}}{A_{\text{kör}}} \quad (6)$$

A_{kör}: Kontrolün absorbansı

A_{örnek}: Örneğin absorbansı

% İnhibisyon-SOD kalibrasyon grafiği denkleminde yararlanarak SOD değerleri µg/L olarak hesaplandı.

$$\% \text{ İ} = 1,1633 \cdot \text{SOD} - 21,1 \quad (7)$$

Bulunan SOD değerleri Toplam Protein miktarına bölünerek SOD aktivitesi hesaplandı. Elde edilen veriler Excel programında grafik haline getirilerek ve SPSS 18 ile istatistik olarak değerlendirildi.

3.3.5.7. Annexin V Protokolü

Annexin V, apoptoz uyarısı alan hücrenin zarının iç yüzeyinde bulunan lipit sırasındaki fosfatidilserinin hücre zarının dış lipit tabakasına geçişinin tespiti esasına dayanır. Bu yer değiştirme apoptozun erken döneminde gerçekleşir. Annexin V fosfatidilserine

bağlanabilen bir protein olduğu için, bu protein floresan bir madde FITC (floresan izotiyosiyanat) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir. Nekrotik hücrelerde de anneksin bağlanması görülebileceği için ayrıca vital bir boya olan propidiyum iyodür (PI) ya da 7-AAD (7-amino-actinomycin D) boyaması da yapılır. Canlı hücreler FITC (-)/7-AAD (-), erken apoptotik hücreler FITC (+)/7-AAD (-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler FITC (+) / 7-AAD (+) olarak ayırt edilir.

- Annexin V için ölüm olan Konsantrasyonlarda çalışma yapıldı.
- Besiyeri aspire edildi, hücreler 300 µl PBS ile yıkandı. PBS aspire edildi.
- 50 µl tripsin eklendi ve 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 3 dakika inkübe edildi.
- Tripsin inhibisyonu için besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak ve ependorf tüpüne alındı.
- +4 °C'de 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Pelette 25 µl süpernatant kalacak şekilde supernatant uzaklaştırıldı.
- 100 µl Annexin V reagent solüsyonu ilave edilerek, 20 dakika oda koşullarında inkübasyona bırakıldı.
- 150 µL deiyonize su ilave edilerek Muse cell analyzer cihazında ölçüm yapıldı.

3.4. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS 18 hazır paket programı kullanıldı. Gruplara tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. Gruplar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulandı ve test sonuçları Ekler bölümünde gösterildi. Post-Hoc analizi için, Duncan Çoklu Karşılaştırma testi istatistiksel analizler sonucunda belirlenen genel bir anlamlılık olması durumunda hangi karşılaştırmaların anlamlı bir fark gösterdiğini bulmak amacıyla uygulandı. Tüm çalışmalar % 95 güven aralığı baz alınarak gerçekleştirilmiş olup, p<0,05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. D vitamini, α -Linolenik Asit ve α -Linolenik Asit+D vitamininin SW480 Hücrelerinde Sitotoksosite, Proliferasyon Üzerine Etkileri

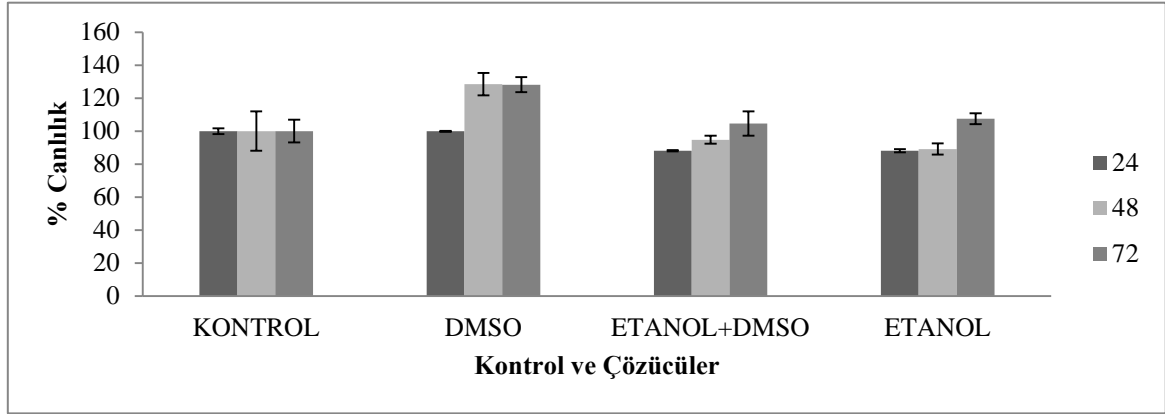
Çalışmada öncelikle D vitamini (D), α -Linolenik Asit+D vitamini (ALA+D) ve α -Linolenik Asit (ALA) konsantrasyonlarının SW480 hücrelerinin canlılığı üzerinde etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla WST-1 testi yapılmıştır. SW480 hücre hattı üzerine her konsantrasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde 3 farklı zamanda uygulanan D, ALA ve ALA+D konsantrasyonları için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonunda WST-1 testi yapılmıştır.

96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 7×10^3 hücre olacak şekilde SW480 hücreleri alınarak Tablo 3'te belirtilen D, ALA ve ALA+D konsantrasyonlarından oluşan gruplar 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C ' de, % 5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir. Bölüm 3.3.5.1.'de anlatıldığı gibi WST-1 testi protokolü uygulanmıştır. Yapılan test 3 kere tekrarlanıp D, ALA ve ALA+D konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin absorbans değerleri her biri için Hücre+Besiyesi+Çözücü içeren kontrol grubu ile normalize edilmiştir.

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında KONTROL (Besiyesi+Hücre) grubu, D vitamini kontrol grubu DMSO (Hücre+Besiyesi+DMSO), ALA+D kontrol grubu ETANOL+DMSO (Hücre+Besiyesi+ETANOL+DMSO) ve ALA kontrol grubu ETANOL (Hücre+Besiyesi+ETANOL) için elde edilen % Canlılık değerleri Tablo 4 ve Şekil 3'te verilmiştir.

Tablo 4. 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerde Kontrol grubu, DMSO, ETANOL+DMSO ve ETANOL için ortalama % Canlılık ve % standart sapma değerleri (n=9)

Çözücüler	% Canlılık					
	24		48		72	
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma
KONTROL	100,0	1,78	100,0	11,96	100,0	6,90
DMSO	99,9	0,37	128,5	6,74	128,2	4,56
ETANOL+DMSO	88,1	0,47	94,8	2,44	104,6	7,38
ETANOL	88,1	1,04	89,2	3,37	107,5	3,37



Şekil 3. SW480 hücrelerinin KONTROL grubu, DMSO, ETANOL+DMSO ve ETANOL ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % Canlılık değerleri (n=9)

DMSO'nun D vitamini 0,01 μ M konsantrasyonundaki maksimum miktarı %1 olup, kuyucuğa eklendiğinde büyüme besiyerindeki maksimum miktarı yaklaşık % 0,1 olarak hesaplanmıştır. ETANOL'ün ALA'nın 0,3 konsantrasyonundaki maksimum miktarı % 3 olup, kuyucuğa eklendiğinde büyüme besiyerindeki maksimum miktarı yaklaşık % 0,3 olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada KONTROL grubu ve çözücülerin ortalama canlılık ve standart sapma değerleri incelendiğinde KONTROL ve çözücüler için istatistiksel hesaplamalarda aşağıdaki kabuller ile yapılmıştır.

KONTROL grubu Besiyeri+Hücre'den oluşmuş olup, besiyeri veya hücreden kaynaklanabilecek bulaşmaların takibi ve hücrelerin normal koşullardaki çoğalma miktarını göstermektedir.

KONTROL grubu ile çözücülerden DMSO'nun ortalama Canlılık değerleri karşılaştırıldığında DMSO'nun 24 saatlik değeri % 99,9 olacak şekilde KONTROL grubuna yakınlık gösterirken, 48 ve 72 saatlerinin KONTROL grubuna göre % 128,5 yüksek olduğu görülmüştür. DMSO ve D vitamininin konsantrasyonları incelendiğinde gerek invert mikroskop görüntülerinde ve gerekse absorbans değerlerinde benzer yükselmeler tespit edilmiş olup, DMSO ile D vitamini konsantrasyonları arasında bir korelasyon olduğu görülmektedir. Bu sebeple, D vitamini konsantrasyonları için kullanılan çözücü DMSO'nun etkileri sıfır alınmış ve DMSO, D vitamini konsantrasyonları için kontrol grubu olarak kabul edilmiştir.

KONTROL grubu ile çözücülerden ETANOL+DMSO'nun ortalama Canlılık değerleri karşılaştırıldığında ETANOL+DMSO'nun 24, 48 ve 72 saatlik Canlılık değerleri kontrol grubuna göre %88,1, % 94,8 ve % 104,6 olduğu görülür. ETANOL+DMSO ve ALA+D Konsantrasyonları incelendiğinde gerek invert mikroskop görüntülerinde ve gerekse absorbans değerlerinde KONTROL grubu yakınlık görülmektedir. ALA+D konsantrasyonları için kullanılan çözücü ETANOL+DMSO'nun etkileri sıfır alınmış ve ETANOL+DMSO, ALA+D konsantrasyonları için kontrol grubu olarak kabul edilmiştir.

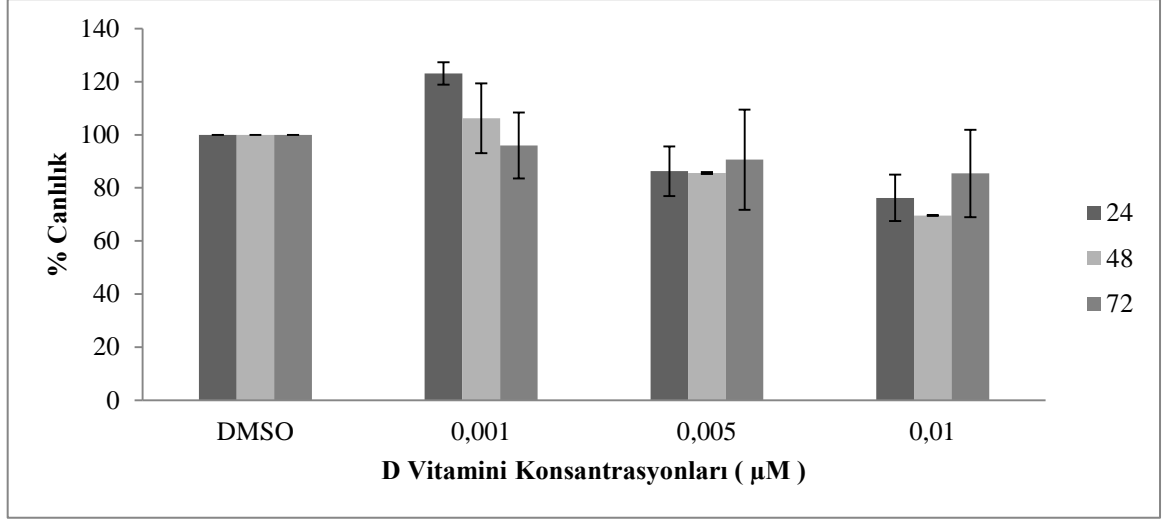
KONTROL grubu ile çözücülerden ETANOL'ün ortalama Canlılık değerleri karşılaştırıldığında ETANOL'ün 24, 48 ve 72 saatlik değerleri sırasıyla % 88,1, % 89,2 ve % 107,5 olduğu görülmüş olup, ETANOL ve ALA konsantrasyonları incelendiğinde gerek invert mikroskop görüntülerinde ve gerekse absorbans değerlerinde KONTROL grubu yakınlık görülmektedir. Bu sebeple ALA konsantrasyonları için kullanılan çözücü ETANOL'ün etkileri sıfır kabul edilmiş ve ETANOL, ALA konsantrasyonları için kontrol grubu olarak kabul edilmiştir.

4.1.1. Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinin WST-1 ile Analizi

SW480 hücrelerinin D vitamini konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre % Canlılık ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar % Ortalama Canlılık \pm Standart Sapma olarak Tablo 5 ve Şekil 3'te verilmiştir.

Tablo 5. 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerde D vitamini uygulamaları için ortalama % Canlılık ve % standart sapma değerleri (n=9)

Saat	Konsantrasyon (μ M)	Ortalama	Standart Sapma
24	DMSO	100,0	0,00
	0,001	123,1	4,20
	0,005	86,3	9,35
	0,01	76,3	8,70
48	DMSO	100,0	0,00
	0,001	106,2	13,15
	0,005	85,5	0,35
	0,01	69,6	0,20
72	DMSO	100,0	0,00
	0,001	96,0	12,40
	0,005	90,6	18,83
	0,01	85,4	16,46



Şekil 3. SW480 hücrelerinin D vitamini ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % Canlılık değerleri (n=9)

Elde edilen WST-1 analizi verilere göre 0,001 µM konsantrasyonu için % Canlılığın 24 saatlik ölçümde maksimum düzeyde artarak % 123,1 olduğunu, 48 saatlik ölçümde azalarak % 106,2'ye düştüğü ve 72 saatlik ölçümde düşmeye devam ederek % 96 olarak ölçülmüştür. Bu durum 0,001 µM gibi düşük D vitamini değerinde ilk 24 saat için diğer konsantrasyonlardan farklı olarak Canlılık değeri ve dolayısıyla hücre proliferasyonu DMSO kontrol grubundan daha fazla artış göstermektedir. 0,005 µM ve 0,01 µM konsantrasyonları için konsantrasyon arttıkça Canlılık ve dolayısıyla hücre proliferasyonu DMSO kontrol grubuna göre daha düşük olmaktadır.

Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksyonu gruplarına ait % Ortalama Canlılık değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-testi uygulanmış olup, Gruplar ve p değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. D vitamini uygulamalarında Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksyonu grupları için p değerleri

Grup	p Değeri
Saat	0,326
Konsantrasyon	<0,001
Saat * Konsantrasyon	0,064

Grupların etkileri istatistiksel olarak incelendiğinde;

Saat*Konsantrasyon interaksiyonu için p değeri 0,064 bulunmuştur. Bu değer $p>0,05$ olduğu için Saat*Konsantrasyon interaksiyonu istatistiksel farklılığı önemli değildir.

Saat grubu için p değeri 0,326 bulunmuştur. Bu değer $p>0,05$ olduğu için Saat grubunun istatistiksel farklılığı önemli değildir, Hücre canlılığı ve proliferasyonu inkübasyon süresine bağlı değildir.

Konsantrasyon grubu için, istatistiksel farklılığı oldukça anlamlıdır ($p<0,001$). Konsantrasyon grubu için Konsantrasyon arttıkça hücre canlılığındaki azalış, Şekil 4'te görülmektedir. Konsantrasyon arttıkça hücre canlılığının ve proliferasyonunun azalmakta olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p<0,05$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama % Canlılık değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup, Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. D vitamini uygulamaları ve % Canlılık \pm Standart Sapma (n=9)

Konsantrasyon (μ M)	%Canlılık \pm Standart Sapma
DMSO	100,00 \pm 0,00 C
0,001	108,43 \pm 15,04 C
0,005	87,48 \pm 10,78 B
0,01	77,10 \pm 11,58 A

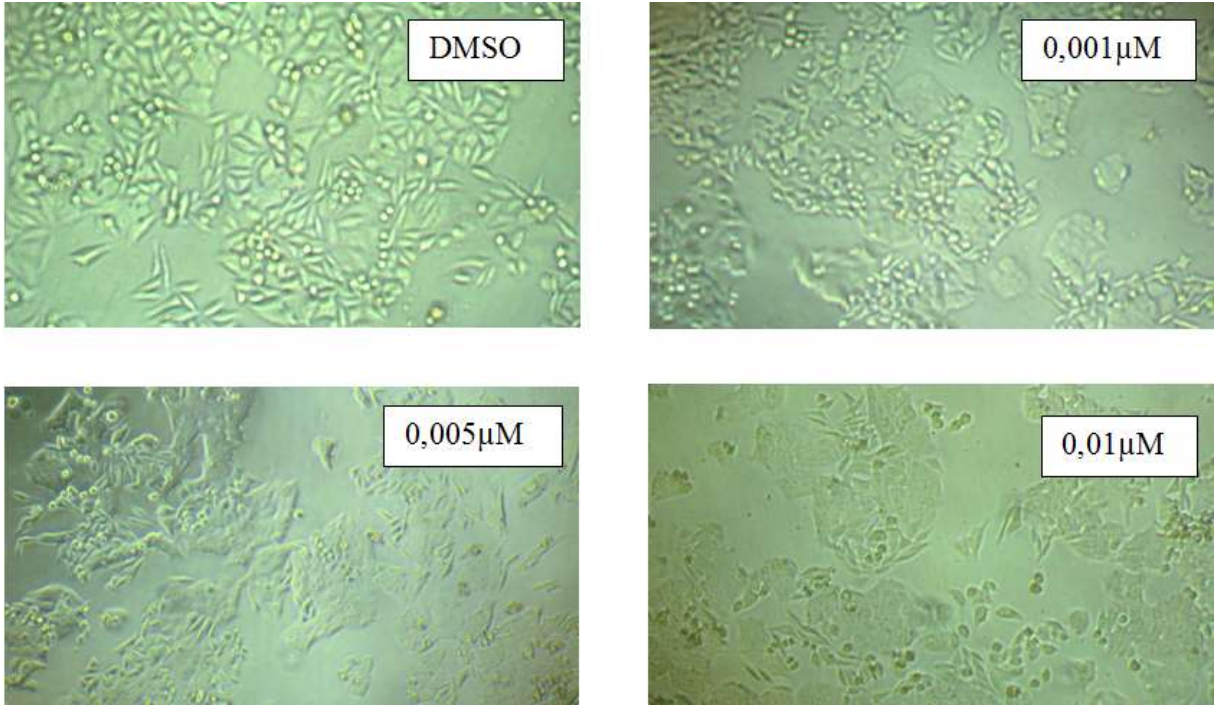
*A, B, C, D simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p<0,05$).

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre;

DMSO ile 0,001 μ M konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. DMSO ile 0,005 μ M ve 0,01 μ M D vitamini konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. 0,001 μ M konsantrasyonu ile 0,005 μ M ve 0,01 μ M konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. 0,005 μ M konsantrasyonu ile 0,01 μ M Konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır ($p<0,05$).

D vitamini konsantrasyonu arttıkça 72 saat sonrasında elde edilen hücre canlılığı değeri % 77,10 olup, standart sapma değeri % 11,58 olarak bulunmuş olup, IC₅₀ değeri tespit edilememiştir.

D vitamini Uygulamalarının 72 saatlik hücre kültürü görüntüleri Resim 12’de görülmekte olup, Hücre sayısı konsantrasyon arttıkça azalmakta olup, istatistiksel sonuçları desteklemektedir. Dahası Konsantrasyon artışı ile birlikte hücrelerin morfolojik yapısı bozularak hücreler genişlemiş gibi görünmektedir.



Resim 12. D vitamini uygulamalarının 72 Saatlik hücre kültürü görüntüleri

4.1.2. Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinin WST-1 ile Analizi

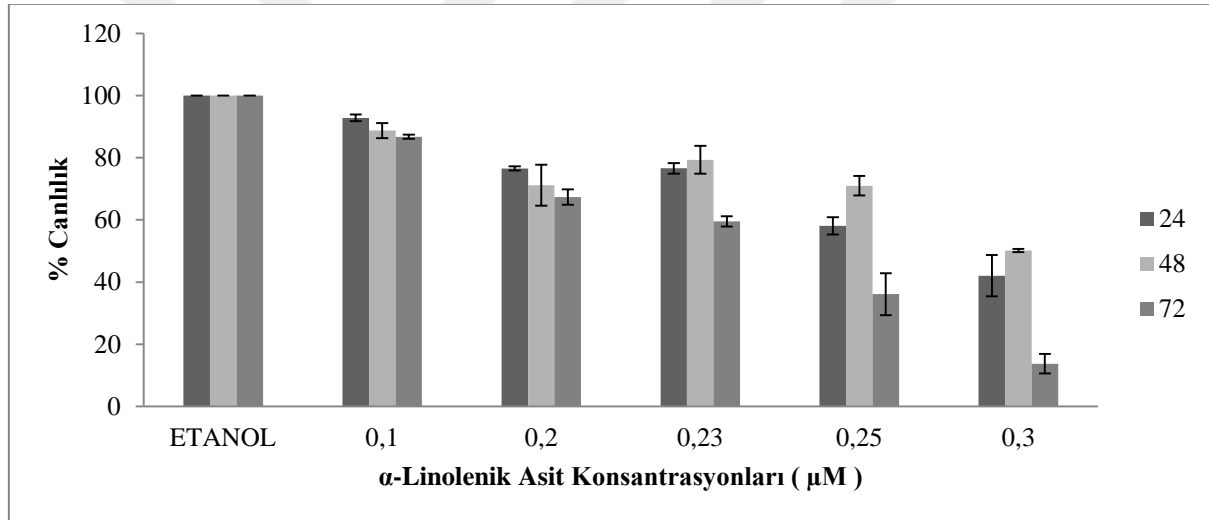
SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit (ALA) konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre, % Canlılık ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar % Ortalama Canlılık \pm Standart Sapma olarak Tablo 8 ve Şekil 4’te verilmiştir.

Tablo 8. 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerde ALA uygulamaları için % ortalama canlılık ve standart sapma değerleri (n=9)

Konsantrasyon (μM)	Saat		
	24	48	72
ETANOL	100,00 \pm 0,00 bE	100,00 \pm 0,00 cE	100,00 \pm 0,00 aE
0,1	92,83 \pm 1,10 bD	88,73 \pm 2,45 cD	86,73 \pm 0,64 aD
0,2	76,53 \pm 0,65 bC	71,13 \pm 6,61 cC	67,37 \pm 2,47 aC
0,23	76,57 \pm 1,70 bC	79,37 \pm 4,51 cC	59,47 \pm 1,66 aC
0,25	58,10 \pm 2,75 bB	70,97 \pm 3,16 cB	36,13 \pm 6,76 aB
0,3	42,07 \pm 6,65 bA	50,17 \pm 0,50 cA	13,70 \pm 3,14 aA

*a,b,c simgeleri birbirlerinden farklı olan sütunların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p < 0,05$).

**A, B, C, D simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4. SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % canlılık değerleri (n=9)

SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında konsantrasyon arttıkça hücre canlılığının ve proliferasyonunun azaldığı görülmektedir. 0,25 μM için 72 saatlik hücre canlılığı değeri % 36,36 olarak bulunmuştur, IC_{50} değeri 0,25 μM olup, 72 saattir. Konsantrasyon ve Saat arttıkça, hücre canlılığı ve proliferasyonundaki azalışın oldukça belirgin olduğu Şekil 4'te görülmektedir.

Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksiyonu gruplarına ait ortalama % Canlılık değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmış olup, Gruplar ve p değerleri Tablo 9'da gösterilmiştir.

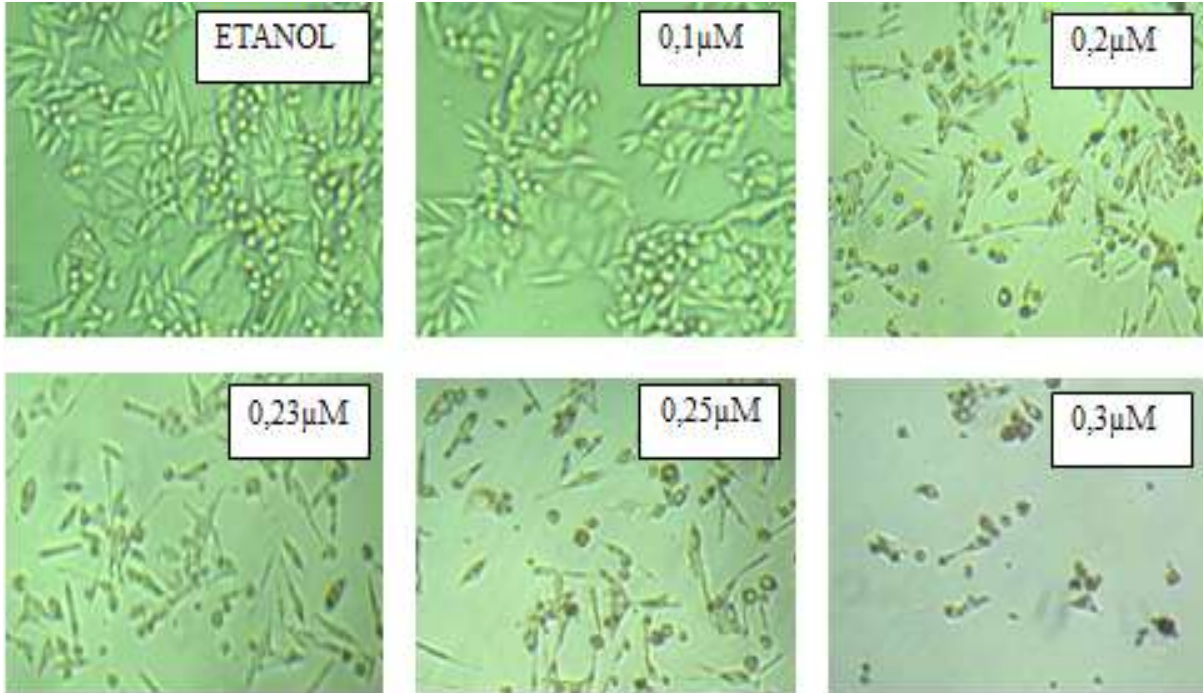
Tablo 9. α -Linolenik Asit Uygulamalarında Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksiyonu Grupları için p değerleri

Grup	p Değeri
Saat	<0,001
Konsantrasyon	<0,001
Saat * Konsantrasyon	<0,001

Grupların etkileri istatistiksel olarak incelendiğinde, Saat*Konsantrasyon interaksiyonu için $p < 0,001$ olup, Saat*Konsantrasyon interaksiyonu için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğunu göstermektedir. Konsantrasyon miktarı arttıkça ve inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak hücre canlılığı ve dolayısıyla hücre proliferasyonu ETANOL kontrol grubuna göre daha fazla azalmaktadır ($p < 0,05$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile Konsantrasyon*Saat interaksiyonu ile % Ortalama Canlılık için istatistiksel olarak farklar anlamlı bulunmuş olup Tablo 8’de gösterilmiştir.

ALA uygulamalarının 72 saatlik hücre kültürü görüntüleri Resim 13’te görülmekte olup, konsantrasyon artışı ile birlikte hücrelerin morfolojik yapısı bozularak uzamalar görülmekte ve hücre canlılığı konsantrasyon arttıkça azalmaktadır.



Resim 13. α -Linolenik Asit uygulamalarının 72 saatlik hücre kültürü görüntüleri

4.1.3. Farklı α -Linolenik Asit+D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinin WST-1 ile Analizi

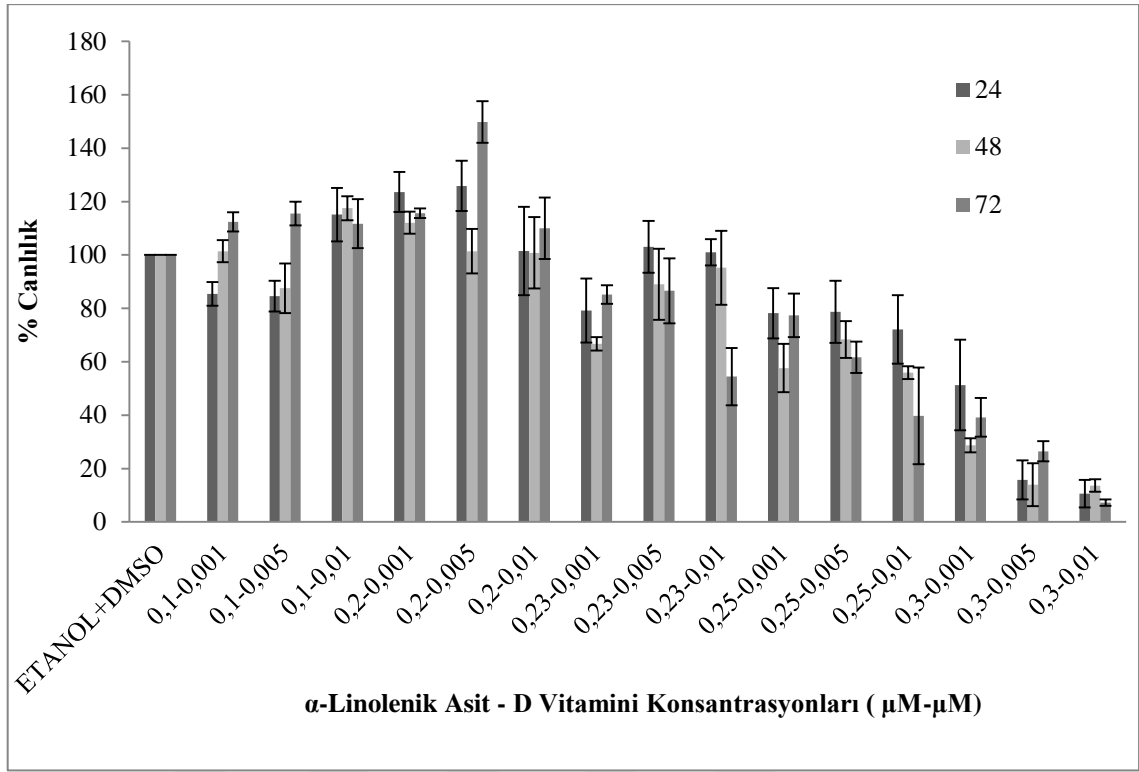
Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar % Ortalama Canlılık \pm Standart Sapma olarak verilmiştir. SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre % Canlılık ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tablo 10, Şekil 5'te verilmiştir.

Tablo 10. 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerde ALA+D uygulamaları için ortalama % Canlılık ve % standart sapma değerleri (n=9)

Konsantrasyon (μ M- μ M)	Saat		
	24	48	72
DMSO+ETANOL	100,00 \pm 0,00 bGH	100,00 \pm 0,00 aGH	100,00 \pm 0,00 bGH
0,1-0,001	85,40 \pm 4,40 bGH	101,43 \pm 4,15 aGH	112,40 \pm 3,55 bGH
0,1-0,005	84,57 \pm 5,81 bGH	87,53 \pm 9,27 aGH	115,53 \pm 4,42 bGH
0,1-0,01	115,13 \pm 10,03 bI	117,50 \pm 4,49 aI	111,73 \pm 9,14 bI
0,2-0,001	123,60 \pm 7,53 bI	112,07 \pm 4,14 aI	115,67 \pm 1,80 bI
0,2-0,005	125,87 \pm 9,40 bJ	101,40 \pm 8,32 aJ	149,83 \pm 7,80 bJ
0,2-0,01	101,50 \pm 16,59 bH	100,83 \pm 13,42 aH	110,03 \pm 11,50 bH
0,23-0,001	79,17 \pm 11,98 bE	66,70 \pm 2,48 aE	85,13 \pm 3,50 bE
0,23-0,005	103,07 \pm 9,73 bG	89,03 \pm 13,30 aG	86,57 \pm 12,17 bG
0,23-0,01	101,00 \pm 4,95 bF	95,20 \pm 13,88 aF	54,47 \pm 10,75 bF
0,25-0,001	78,20 \pm 9,40 bE	57,63 \pm 9,05 aE	77,37 \pm 8,19 bE
0,25-0,005	78,67 \pm 11,63 bE	68,33 \pm 6,94 aE	61,63 \pm 5,87 bE
0,25-0,01	72,13 \pm 12,84 bD	55,90 \pm 2,40 aD	39,77 \pm 18,13 bD
0,3-0,001	51,27 \pm 17,00 bC	28,70 \pm 2,63 aC	39,17 \pm 7,22 bC
0,3-0,005	15,70 \pm 7,31 bB	13,93 \pm 7,99 aB	26,47 \pm 3,76 bB
0,3-0,01	10,53 \pm 5,15 bA	13,63 \pm 2,34 aA	7,20 \pm 1,21 bA

*a, b simgeleri birbirlerinden farklı olan sütunların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).

**A, B, C, D simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 5. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % Canlılık değerleri (n=9)

SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında D vitamini ile birlikte ALA'nın düşük konsantrasyonları olan 0,1 ve 0,2 μM konsantrasyonları için hücre canlılığında bir artış gözlenmekte iken, ALA konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı azalmakta olup, Tablo 10 ve Şekil 5'te görülmektedir.

0,23-0,01 μM için 72 saatlik % Canlılık değeri % 54,5 olarak bulunmuştur, 0,25-0,01 μM için 48 ve 72 saatlik Canlılık değerleri sırasıyla % 55,9, % 39,2 olarak bulunmuştur, 0,3-0,001 μM için 24, 48 ve 72 saatlik Canlılık değerleri sırasıyla % 51,3, % 28,7 ve % 39,2 olarak tespit edilmiş olup, IC₅₀ değeri 0,25-0,01 μM olup, 72 saat olarak tespit edilmiştir.

Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksiyon gruplarına ait ortalama % Canlılık değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-testi uygulanmış olup, Gruplar ve p değerleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

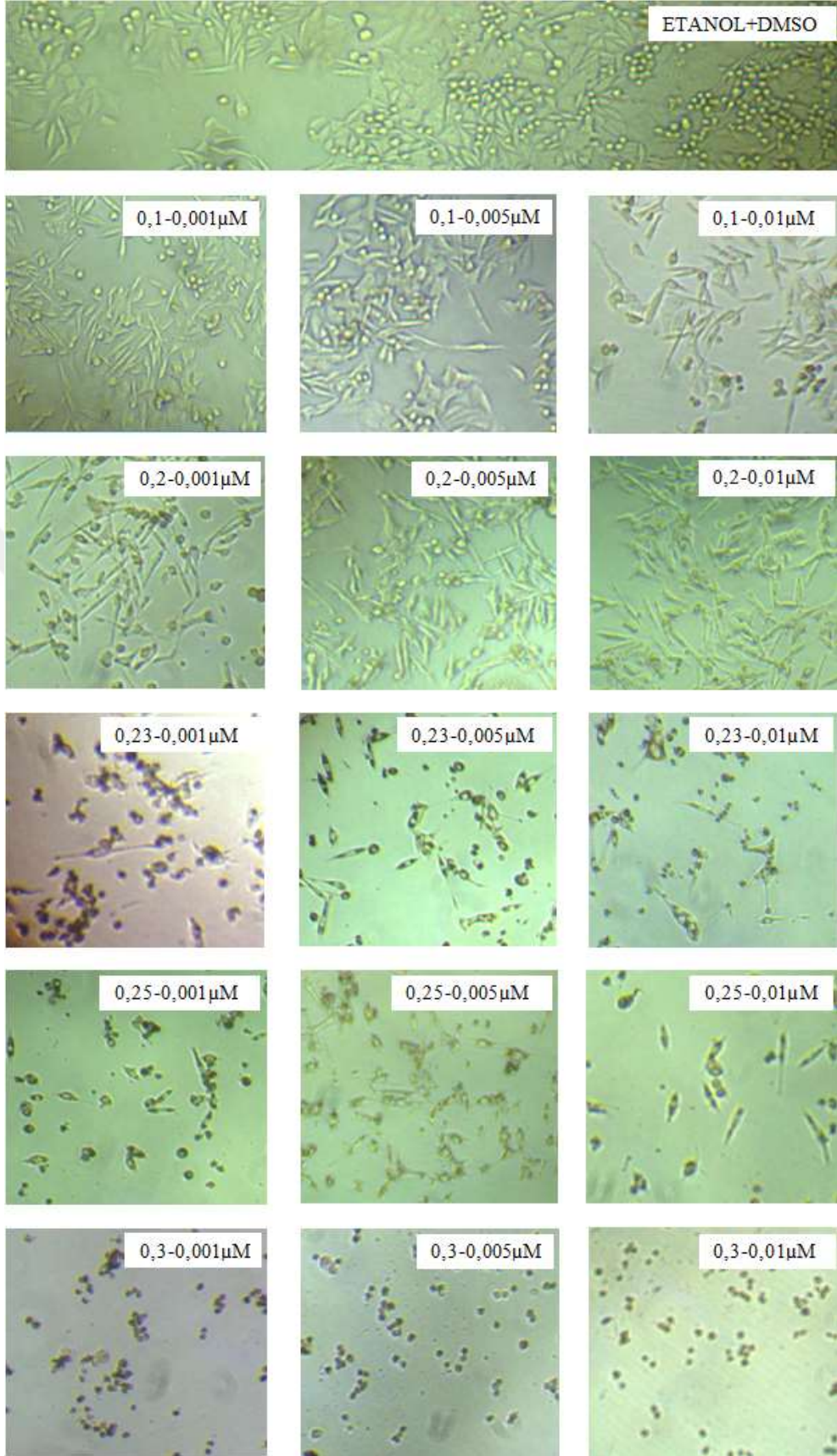
Tablo 11. ALA+D uygulamalarında Saat, Konsantrasyon ve Saat*Konsantrasyon interaksyonu Grupları için p değerleri

Grup	p Değeri
Saat	<0,001
Konsantrasyon	<0,001
Saat * Konsantrasyon	<0,001

Grupların etkileri istatistiksel olarak incelendiğinde, Saat*Konsantrasyon interaksyonu için $p<0,001$ bulunmuş olup, Saat*Konsantrasyon interaksyonu için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğunu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Konsantrasyon miktarı arttıkça ve inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak, hücre canlılığı ve dolayısıyla hücre proliferasyonu ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre daha fazla azalmaktadır ($p<0,05$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ALA+D Konsantrasyonları için Saat*Konsantrasyon interaksyonu ile ortalama % Canlılık için istatistiksel olarak farklar anlamlı bulunmuş olup Tablo 10’da gösterilmiştir.

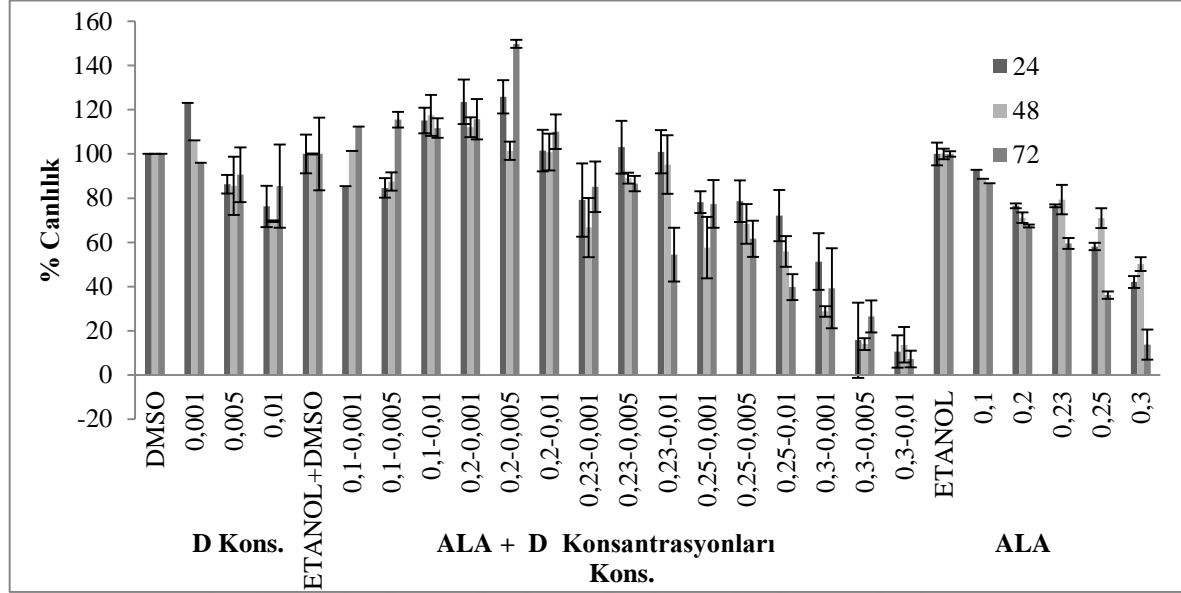
ALA+D uygulamalarının 72 saatlik hücre kültürü görüntüleri Resim 14’te görülmekte olup, konsantrasyon artışı ile birlikte hücrelerin morfolojik yapısı bozularak uzamalar görülmekte ve hücre miktarı konsantrasyon arttıkça azalmaktadır. Hücre yapısındaki bozulmalar Resim 13’teki ALA konsantrasyonlarının 72 saatlik hücre kültürü görüntüleriyle benzer olduğu görülmektedir. Bu durum ALA konsantrasyonlarının, D konsantrasyonlarından daha etkin olduğunu göstermektedir.



Resim 14. ALA+D uygulamalarının 72 saatlik hücre kültürü görüntüleri

4.1.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının WST-1 Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

WST-1 analizi sonuçlarına göre D, ALA+D ve ALA uygulamaları karşılaştırılması Şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 6. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % Canlılık değerleri (n=9)

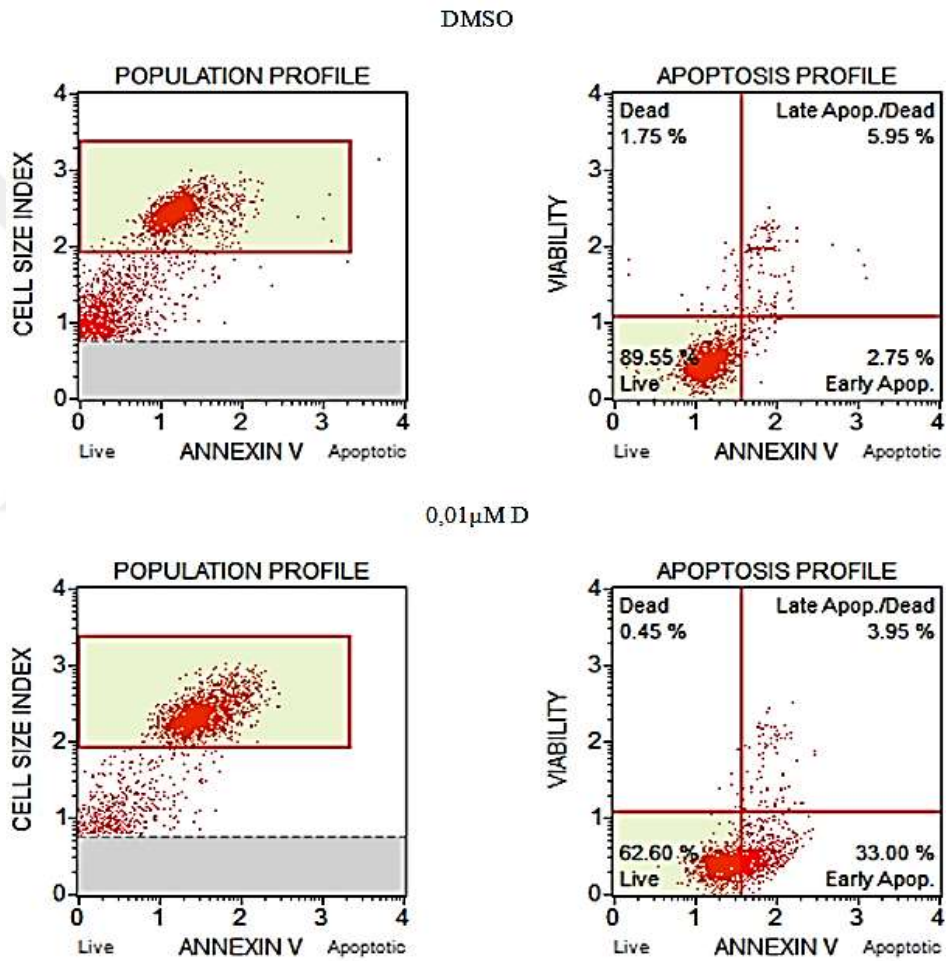
ALA+D konsantrasyonları bir arada kullanıldığında düşük ALA konsantrasyonları (0,1-0,001, 0,1-0,005, 0,1-0,01, 0,2-0,001, 0,2-0,005, 0,2-0,01 $\mu\text{M}-\mu\text{M}$) için % canlılık değerlerinde D konsantrasyonları ve ALA konsantrasyonlarından farklı olarak artış gözlenirken, yüksek ALA konsantrasyonları (0,3-0,001, 0,3-0,005 ve 0,3-0,01 $\mu\text{M}-\mu\text{M}$) için % Canlılığın ALA konsantrasyonlarından daha düşük olduğu Şekil 6'da görülmektedir. Hücre canlılığının inhibisyonunun daha çok ALA'nın etkisiyle olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Apoptozis Analizi

D, ALA+D ve ALA'nın ölüm olan konsantrasyonlarda apoptozis analizi Annexin V (Invitrogen, Camarillo,- CA) floresan izotiyosiyanat (FITC) boyama yöntemi ile yapıldı.

4.2.1. D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 hücrelerinin Apoptozis Analizi

WST-1 analizi sonuçlarına göre; çalışmada kullanılan konsantrasyonların en büyüğü olan 0,01 μM D vitamini konsantrasyonu için 72 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen ortalama canlılık değeri % 77,10 olup, IC_{50} değeri tespit edilememiştir. Bu duruma istinaden SW480 hücrelerinde apoptoz ölçümü için DMSO ve çalışmada kullanılan en yüksek D vitamini konsantrasyonu olan 0,01 μM D konsantrasyonu için Annexin V analizi yapılmış ve sonuçları Şekil 7’de gösterilmiştir.

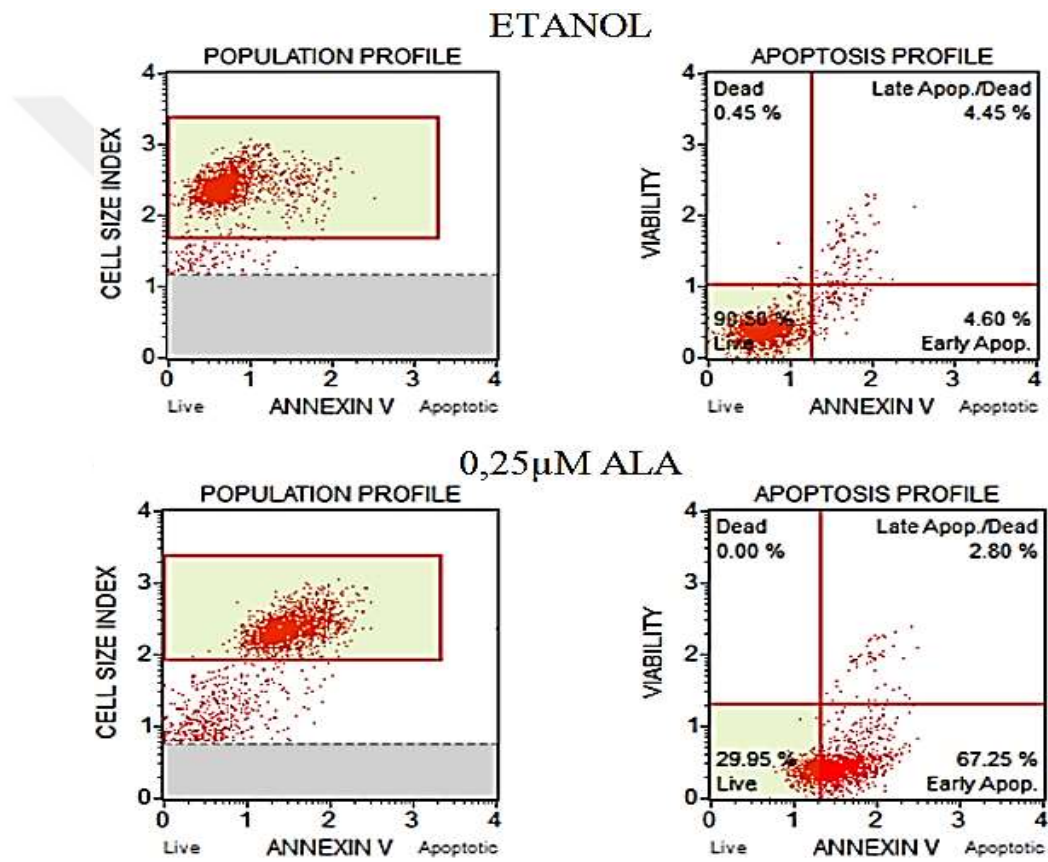


Şekil 7. SW480 hücrelerinin DMSO ve 0,01 μM D konsantrasyonu ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen apoptoz değerleri

DMSO kontrol grubunda yaşam oranı % 89,55 iken, 0,01 μM konsantrasyonu için % 62,60 bulunmuştur. DMSO kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evreleri değerinin % 2,75’ten % 33,00’a çıktığı tespit edilmiştir. Toplam ölüm oranı % 36,95 olarak hesaplanmıştır.

4.2.2. α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında SW480 hücrelerinin Apoptozis Analizi

WST-1 analizi sonuçlarına göre; SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrası elde edilen verilere göre; 0,25 μ M için 72 saatlik ortalama canlılık değeri %36,36 olarak bulunmuştur, IC_{50} konsantrasyonu 0,25 μ M olup, inkübasyon süresi 72 saattir. Bu duruma istinaden SW480 hücrelerinin ALA konsantrasyonları ile muamelesinde apoptoz ölçümü için ETANOL kontrol grubu ile IC_{50} konsantrasyonu olan 0,25 μ M ALA konsantrasyonu için Annexin V analizi sonuçları Şekil 8'de gösterilmiştir.

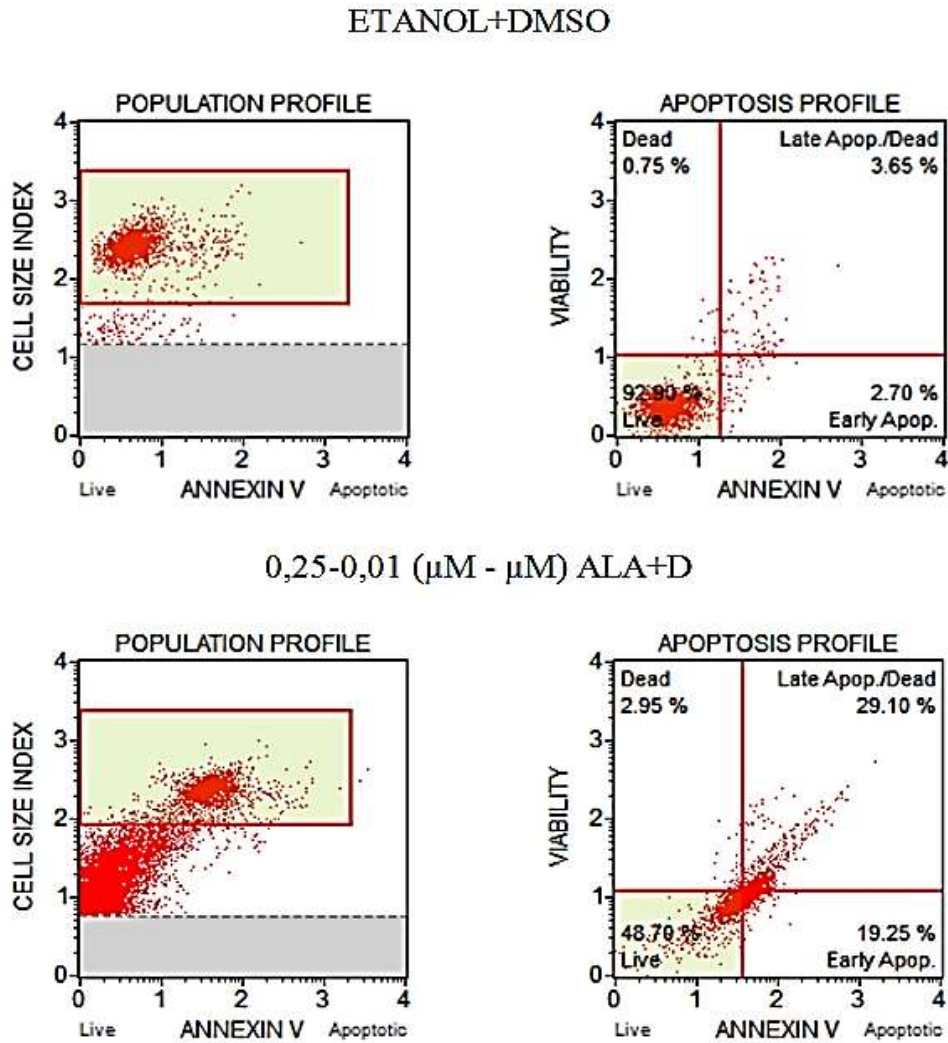


Şekil 8. SW480 hücrelerinin ETANOL ve 0,25 μ M ALA konsantrasyonu ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen apoptoz değerleri

ETANOL kontrol grubunda yaşam oranı % 90,50 iken, 0,25 μ M konsantrasyonu için % 29,95 bulunmuştur. ETANOL kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evreleri değerinin % 4,60'dan % 67,25'e çıktığı tespit edilmiştir. Toplam ölüm oranı % 70,05 olarak hesaplanmıştır.

4.2.3. α -Linolenik Asit-D vitamini Konsantrasyonlarında SW480 hücrelerinin Apoptozis Analizi

WST-1 analizi sonuçlarına göre; SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit+D vitamini konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrası elde edilen verilere göre; 0,25-0,01 ALA+D konsantrasyonu için 72 saatlik ortalama canlılık değeri % 39,2 olarak tespit edilmiş olup, IC₅₀ konsantrasyonu 0,25-0,01 (μ M- μ M) olup, inkübasyon süresi 72 saattir. Bu duruma istinaden SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile muamelesinde apoptoz ölçümü için ETANOL+DMSO kontrol grubu ile IC₅₀ konsantrasyonu olan 0,25-0,01 (μ M- μ M) ALA+D konsantrasyonu için Annexin V analizi sonuçları Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9. SW480 hücrelerinin ETANOL+DMSO ve 0,25-0,01 (μ M- μ M) ALA+D konsantrasyonu ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen apoptoz değerleri

ETANOL+DMSO kontrol grubunda yaşam oranı % 92,90 iken, 0,25-0,01 (μM - μM) ALA+D konsantrasyonu için % 48,70 bulunmuştur. ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin geç evreleri değerinin % 3,65'ten, % 29,10'a çıktığı tespit edilmiştir. ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evreleri değerinin % 2,70'den, % 19,25'e çıktığı tespit edilmiştir. Toplam ölüm oranı % 48,35 olarak hesaplanmıştır.

4.3. Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Çalışmada çeşitli D vitamini, α -Linolenik Asit+D vitamini ve α -Linolenik Asit konsantrasyonlarının SW480 hücrelerinin total (toplam) protein miktarı üzerinde etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla BCA total protein tayini yapılmıştır. SW480 hücre hattı üzerine her konsantrasyon için 2 tekrarlı olacak şekilde uygulanan D vitamini, Dvitamini+Linolenik Asit ve Linolenik Asit konsantrasyonları için 72 saatlik inkübasyonlar sonunda BCA Total Protein miktarları belirlenmiştir.

24 kuyucuklu plaklara her kuyucukta $2,8 \times 10^4$ hücre olacak şekilde SW480 hücreleri alınarak Tablo 3'te belirtilen D vitamini, α -Linolenik Asit+D vitamini ve α -Linolenik Asit konsantrasyonlarından oluşan gruplar 72 saat süresince 37°C ' de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir. Bölüm 3.3.4.2 ve 3.3.5.2.'de anlatıldığı gibi BCA total protein ön işlemleri ve protokolü uygulanmıştır. Yapılan test D vitamini, α -Linolenik Asit+D vitamini ve α -Linolenik Asit konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin absorbans değerleri her biri için Hücre+Besiyeri+Çözücü içeren kontrol grubu ile normalize edilmiştir.

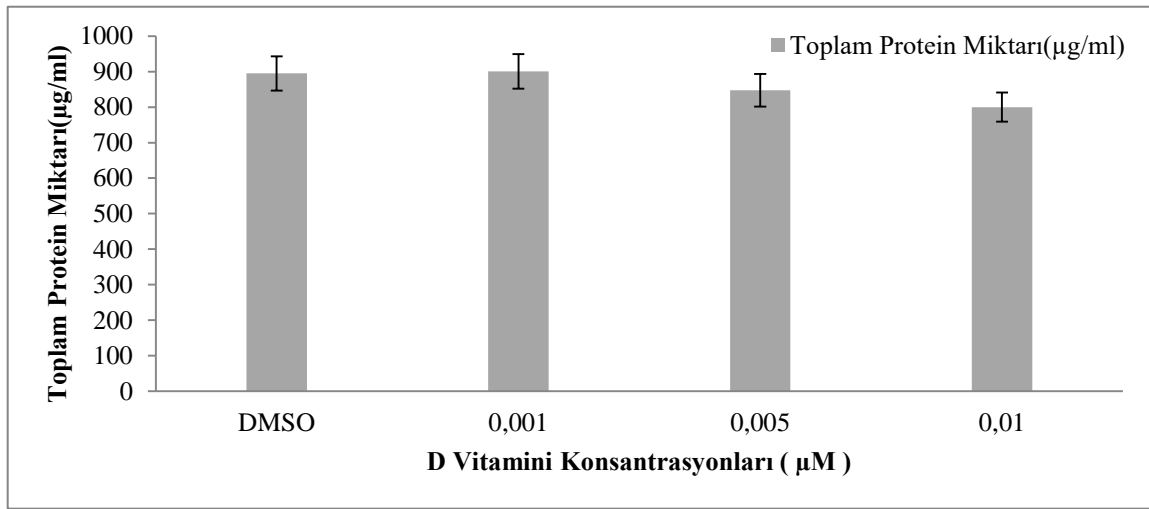
4.3.1. Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinde Total Protein Miktar Tayini

SW480 hücrelerinin D vitamini konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama Toplam (Total) Protein Miktarı ve Standart Sapma olarak Tablo 12 ve Şekil 10'da verilmiştir.

Tablo 12. 72 saatlik ölçümlerde D vitamini uygulamaları için ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μM)	Ortalama Toplam Protein Miktarı ($\mu\text{g/ml}$)
DMSO	895,0 \pm 48,1 C
0,001	901,0 \pm 48,4 C
0,005	847,0 \pm 45,8 B
0,01	800,0 \pm 40,9 A

*A, B, C, D simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p < 0,05$).



Şekil 10. SW480 hücrelerinin D vitamini ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen ortalama toplam protein miktarı değerleri

Konsantrasyon grubuna ait ortalama toplam protein miktarı değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır.

Konsantrasyon grubu için konsantrasyon arttıkça toplam protein miktarındaki azalış Şekil 10'da görülmektedir. $p < 0,001$ olduğu için, Konsantrasyon grubunun istatistiksel farklılığının anlamlı olduğunu tespit edilmiş olup, Konsantrasyon arttıkça toplam protein miktarı azalmaktadır ($p < 0,001$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama toplam protein miktarı değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup Tablo 12'de gösterilmiştir.

Ortalama toplam protein miktarı değerleri için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p<0,05$); DMSO ile 0,001 μM konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. DMSO ile 0,005 μM ve 0,01 μM D vitamini konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. 0,001 μM konsantrasyonu ile 0,005 μM ve 0,01 μM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. 0,005 μM konsantrasyonu ile 0,01 μM konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır ($p<0,05$).

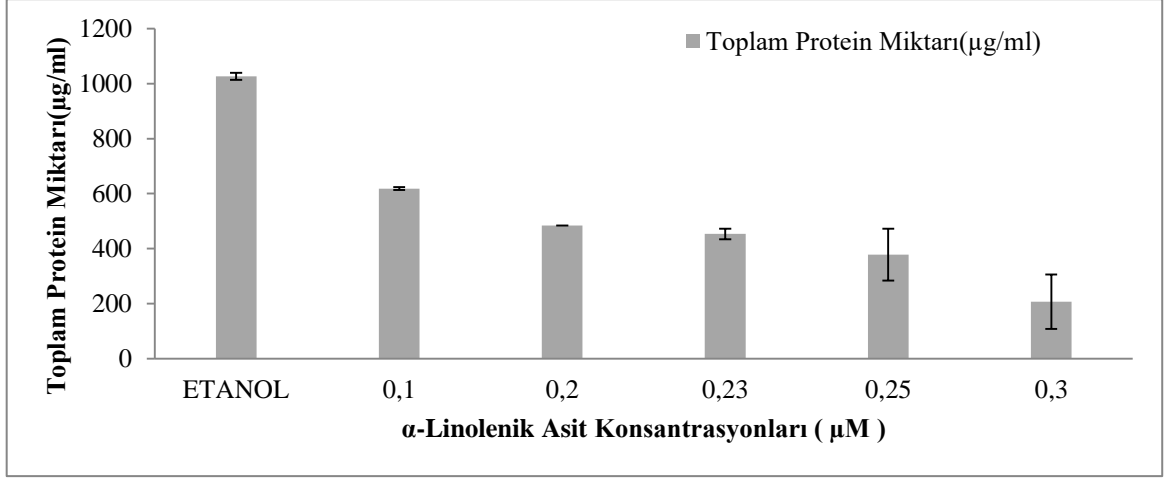
4.3.2. Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinde Total Protein Miktar Tayini

SW480 hücrelerinin ALA konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorban değerlerine göre ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama Toplam protein Miktarı ve Standart Sapma olarak Tablo 13 ve Şekil 11’de verilmiştir.

Tablo 13. 72 saatlik ölçümlerde ALA uygulamaları için ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μM)	Ortalama Toplam Protein Miktarı ($\mu\text{g/ml}$)
ETANOL	1026,0 \pm 12,7 D
0,1	618,5 \pm 4,9 C
0,2	485,0 \pm 0,0 BC
0,23	453,5 \pm 19,1 B
0,25	378,5 \pm 94,0 B
0,3	207,0 \pm 99,0 A

*A, B, C, D simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 11. SW480 hücrelerinin ALA ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen ortalama toplam protein miktarı değerleri

Konsantrasyon grubuna ait ortalama toplam protein miktarı değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır.

Konsantrasyon grubu için konsantrasyon arttıkça toplam protein miktarındaki azalış oldukça belirgin olup, Şekil 11’de görülmektedir. Konsantrasyon grubunun istatistiksel farklılığının oldukça anlamlı olduğunu belirlenmiş olup, $p < 0,001$ olarak tespit edilmiştir. Konsantrasyon arttıkça toplam protein miktarı belirgin bir şekilde azalmaktadır ($p < 0,001$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama toplam protein miktarı değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup Tablo 13’te gösterilmiştir.

Ortalama toplam protein miktarı değerleri için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p < 0,05$);

ETANOL kontrol grubu ile bütün ALA konsantrasyonları arasındaki istatistiksel olarak fark anlamlıdır. 0,3 µM ile bütün ALA konsantrasyonları istatistiksel olarak fark anlamlıdır. 0,1µM ile 0,2 µM ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamakta olup, 0,1 µM Konsantrasyonu ile diğer bütün ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. 0,2, 0,23 ve 0,25 µM ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır ($p < 0,05$).

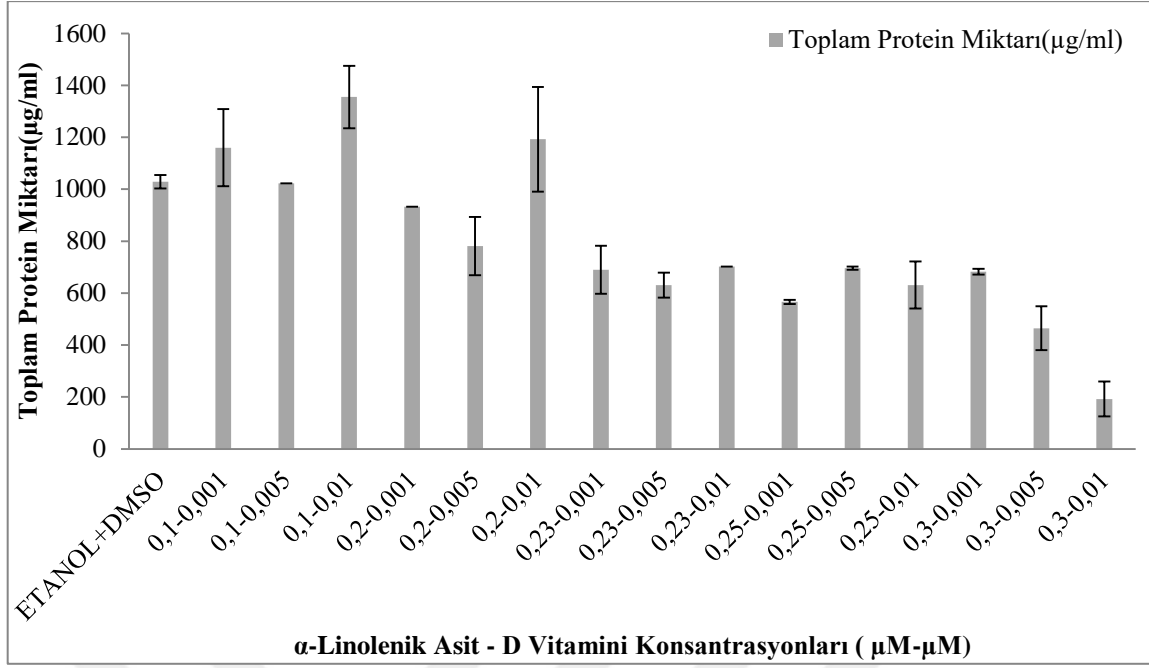
4.3.3. Farklı α -Linolenik Asit+D Vitamini Konsantrasyonlarında SW480 Hücrelerinde Total Protein Miktar Tayini

Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama Toplam protein Miktarı ve Standart Sapma olarak verilmiştir. SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorban değerlerine göre ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tablo14 ve Şekil 12’de verilmiştir.

Tablo 14. 72 saatlik ölçümlerde ALA+D uygulamaları için ortalama toplam protein miktarı ve standart sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μ M- μ M)	Ortalama Toplam Protein Miktarı \pm Standart Sapma
ETANOL+DMSO	1029 \pm 26,2 FG
0,1-0,001	1160 \pm 167,5 G
0,1-0,005	1022 \pm 0,0 FG
0,1-0,01	1355 \pm 158,4 H
0,2-0,001	932 \pm 0,0 EF
0,2-0,005	781 \pm 84,8 DE
0,2-0,01	1193 \pm 233,7 GH
0,23-0,001	690 \pm 61,7 CD
0,23-0,005	631 \pm 29,5 BCD
0,23-0,01	702 \pm 0,0 CD
0,25-0,001	566 \pm 4,7 BC
0,25-0,005	696 \pm 3,8 CD
0,25-0,01	631 \pm 55,5 BCD
0,3-0,001	683 \pm 7,0 CD
0,3-0,005	465 \pm 38,4 B
0,3-0,01	193 \pm 12,6 A

*A, B, C, D vb. simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 12. SW480 hücrelerinin ALA+D ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen ortalama toplam protein miktarı değerleri

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama toplam protein miktarı değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup Tablo 14’te gösterilmiştir.

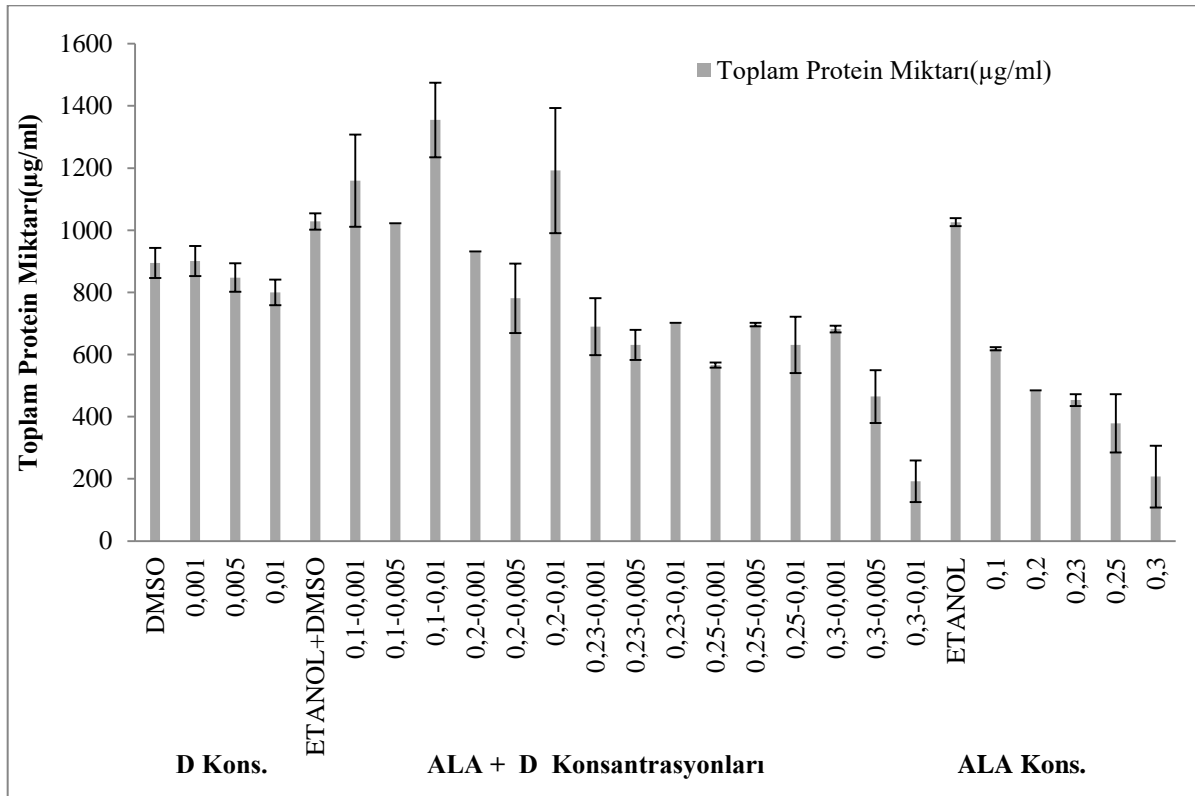
Ortalama toplam protein miktarı değerleri için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p < 0,05$);

0,3-0,01 µM-µM konsantrasyonu ile bütün ALA+D konsantrasyonları arasındaki istatistiksel fark anlamlıdır. 0,3-0,005, 0,25-0,001, 0,23-0,005 ve 0,25-0,01 µM-µM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamakta olup, 0,3-0,05 µM-µM konsantrasyonu ile diğer bütün ALA+D konsantrasyonları arasındaki istatistiksel fark anlamlıdır. 0,25-0,001, 0,23-0,005, 0,25-0,01, 0,3-0,001, 0,23-0,001, 0,25-0,005, 0,23-0,01 µM-µM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,23-0,005, 0,25-0,01, 0,3-0,001, 0,23-0,001, 0,25-0,005, 0,23-0,01 ve 0,2-0,005 µM-µM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,2-0,005 ve 0,2-0,001 µM-µM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. ETANOL+DMSO, 0,2-0,001 ve 0,1-0,005 µM-µM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. ETANOL+DMSO, 0,1-0,005, 0,1-0,001 ve 0,2-0,01 µM-µM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamakta olup, diğer

bütün ALA+D konsantrasyonları arasındaki istatistiksel fark anlamlıdır. 0,2-0,01 ve 0,1-0,01 μM - μM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır ($p < 0,05$).

4.3.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının Total Protein Tayini Sonuçlarının Karşılaştırılması

Toplam protein analizi sonuçlarına göre D, ALA+D ve ALA uygulamaları karşılaştırılması Şekil 13'te gösterilmektedir.



Şekil 13. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen toplam protein değerleri

ALA+D konsantrasyonları bir arada kullanıldığında özellikle düşük ALA konsantrasyonları (0,1-0,001, 0,1-0,005, 0,1-0,01, 0,2-0,001, 0,2-0,005, 0,2-0,01 μM - μM) için toplam protein miktarında D konsantrasyonları ve ALA konsantrasyonlarından farklı olarak toplam protein miktarlarında artış belirlenmiştir.

4.4. MDA Analizi

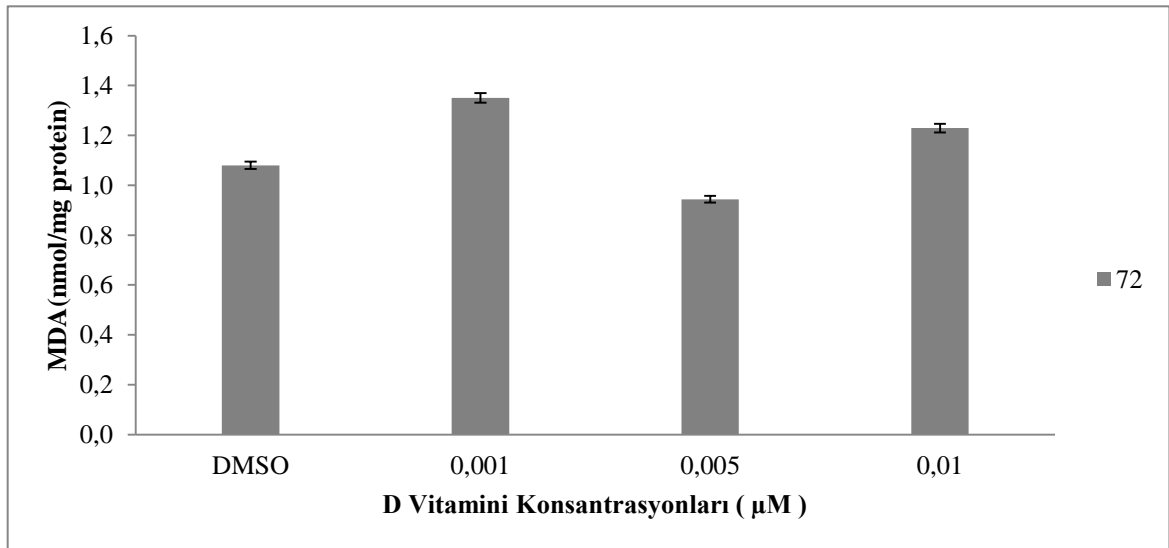
4.4.1. SW480 Hücrelerinin Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında MDA Analizi

SW480 hücrelerinin D vitamini konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorban değerlerine göre ortalama MDA ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar ortalama MDA \pm Standart Sapma olarak Tablo 15 ve Şekil 14'te verilmiştir.

Tablo 15. SW480 hücrelerinin D vitamini uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μM)	MDA (nmol/mg protein)
DMSO	1,08 \pm 0,02 B
0,001	1,35 \pm 0,02 D
0,005	0,94 \pm 0,01 A
0,01	1,23 \pm 0,02 C

*A, B, C, D büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 14. SW480 hücrelerinin D vitamini uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait ortalama MDA değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır.

Konsantrasyon için $p < 0,001$ bulunmuş olup, istatistiksel farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Farklı konsantrasyon uygulamalarında, MDA miktarındaki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,001$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama MDA değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup, Tablo 15'te gösterilmiştir. MDA değerleri için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p < 0,05$);

DMSO ile bütün D vitamini konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. Bütün D vitamini konsantrasyonlarının birbirleri arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır ($p < 0,05$).

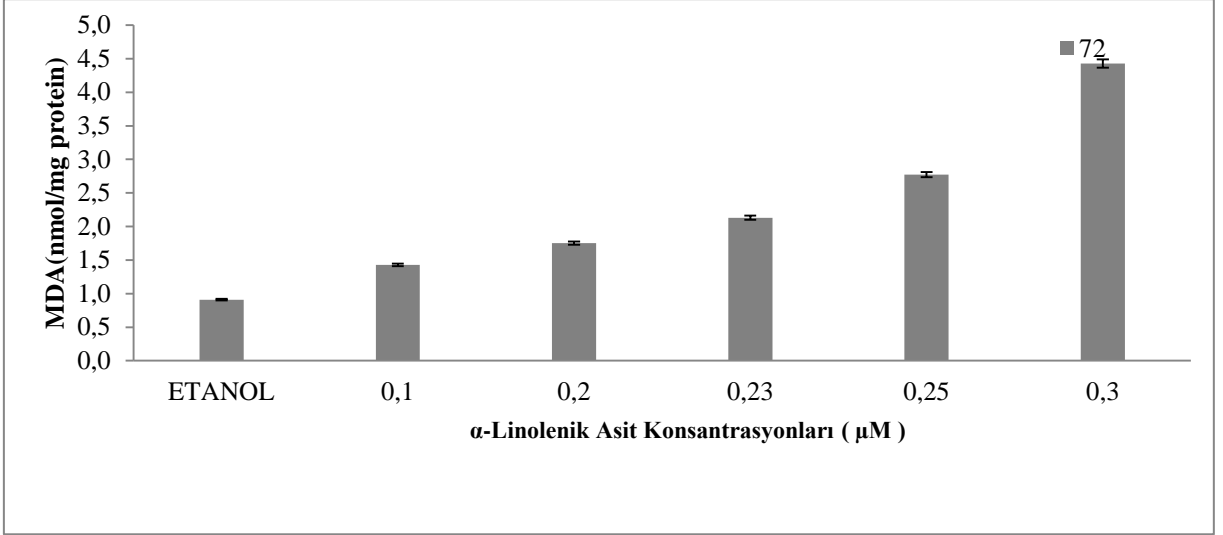
4.4.2. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında MDA Analizi

SW480 hücrelerinin α - Linolenik asit (ALA) konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre ortalama MDA ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama MDA ve Standart Sapma olarak Tablo 16 ve Şekil 15'te verilmiştir.

Tablo 16. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon(μ M)	MDA (nmol/mg protein)	
ETANOL	0,91 \pm 0,013	A
0,1	1,43 \pm 0,020	B
0,2	1,75 \pm 0,025	C
0,23	2,13 \pm 0,030	D
0,25	2,77 \pm 0,039	E
0,3	4,43 \pm 0,062	F

*A, B, C, D, E, F büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p < 0,05$).



Şekil 15. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait ortalama MDA değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır. Konsantrasyon için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Konsantrasyon arttıkça MDA düzeylerinde artma olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama MDA değerleri için istatistiksel olarak farklar anlamlı bulunmuş olup, Tablo 16'da gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p < 0,05$);

ETANOL ile bütün ALA vitamini dozları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. Bütün ALA konsantrasyonlarının birbirleri ile arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır ($p < 0,05$).

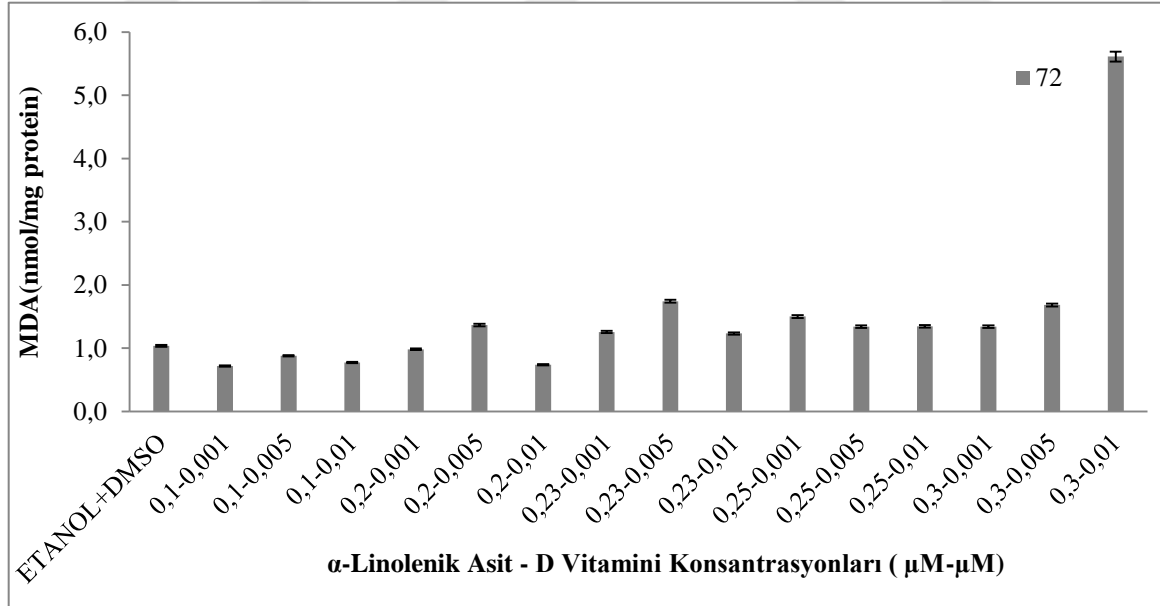
4.4.3. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit+D vitamini Konsantrasyonlarında MDA Analizi

SW480 hücrelerinin ALA+D Konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre ortalama MDA ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama MDA ve Standart Sapma olarak Tablo 17, Şekil 16'da verilmiştir.

Tablo 17. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μM - μM)	MDA (nmol/mg protein)	
ETANOL+DMSO	1,04 \pm 0,015	E
0,1-0,001	0,72 \pm 0,010	A
0,1-0,005	0,88 \pm 0,012	C
0,1-0,01	0,77 \pm 0,011	B
0,2-0,001	0,98 \pm 0,014	D
0,2-0,005	1,37 \pm 0,019	H
0,2-0,01	0,74 \pm 0,010	A
0,23-0,001	1,26 \pm 0,018	G
0,23-0,005	1,74 \pm 0,024	L
0,23-0,01	1,23 \pm 0,017	F
0,25-0,001	1,50 \pm 0,021	J
0,25-0,005	1,34 \pm 0,019	H
0,25-0,01	1,35 \pm 0,019	H
0,3-0,001	1,35 \pm 0,019	H
0,3-0,005	1,68 \pm 0,024	K
0,3-0,01	5,61 \pm 0,079	M

*A, B, C, D, E, F büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 16. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait ortalama MDA değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır. Konsantrasyon için istatistiksel

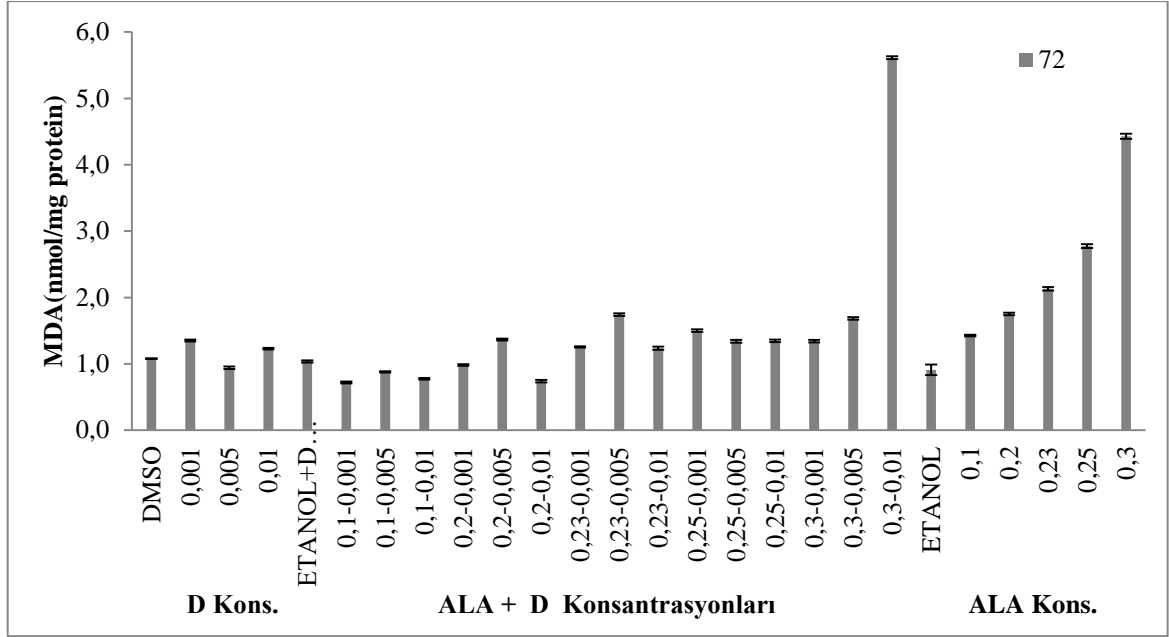
farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Konsantrasyon arttıkça, MDA düzeylerinde artma olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ALA+D konsantrasyonları için Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama MDA için istatistiksel olarak farklar anlamlı bulunmuş olup Tablo 17’de gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p < 0,05$);

0,1-0,001 μM - μM ALA+D konsantrasyonu ile 0,2-0,01 μM - μM ALA+D konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,25-0,005, 0,25-0,01, 0,3-0,001 ve 0,2-0,005 μM - μM ALA+D konsantrasyonlarının arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. Diğer bütün ALA+D konsantrasyonlarının aralarındaki fark anlamlıdır. ETANOL+ DMSO ile bütün konsantrasyonlar arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0,05$).

4.4.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının MDA Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması

MDA sonuçlarına göre D, ALA+D ve ALA konsantrasyonlarının karşılaştırılması Şekil 17’de gösterilmektedir.



Şekil 17. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen MDA değerleri

D, ALA+D ve ALA konsantrasyonları için MDA değerleri karşılaştırıldığında bütün D konsantrasyonları için DMSO kontrol grubuna göre MDA değerleri artmıştır. ALA ve ALA+D konsantrasyonları için konsantrasyon arttıkça MDA düzeylerinde artma olduğu tespit edilmiştir.

4.5. NO Analizi

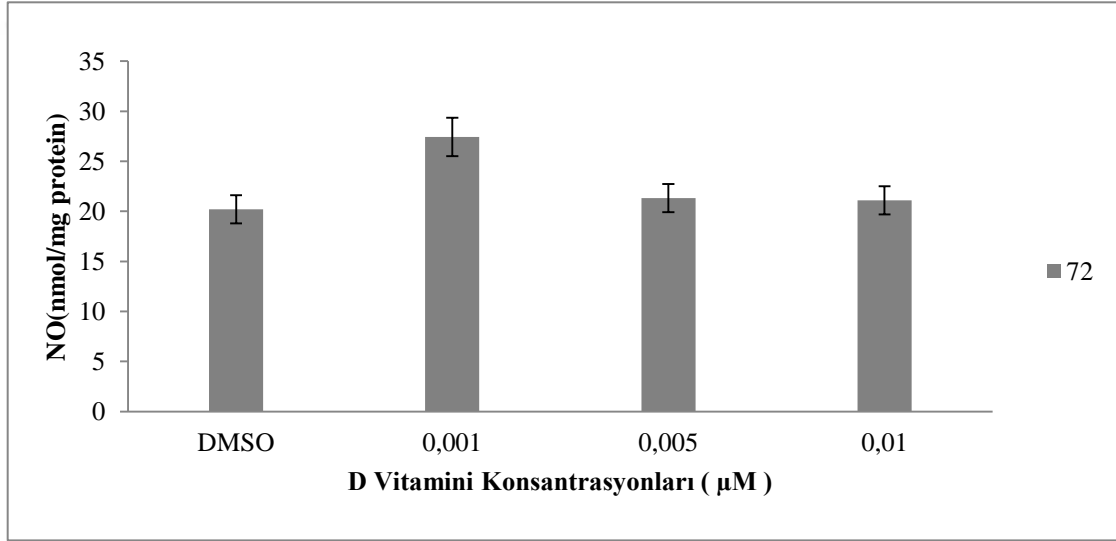
4.5.1. SW480 Hücrelerinin Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında NO Analizi

SW480 hücrelerinin D vitamini konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre ortalama NO ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar NO ve Standart Sapma olarak Tablo 18 ve Şekil 18'de verilmiştir.

Tablo 18. SW480 hücrelerinin D vitamini uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μ M)	NO(nmol/mg protein)
DMSO	20,20 \pm 1,41 A
0,001	27,40 \pm 1,92 B
0,005	21,30 \pm 1,10 A
0,01	21,10 \pm 1,40 A

*A, B, C, D büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farklı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 18. SW480 hücrelerinin D vitamini uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait NO değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır.

Konsantrasyon için p değeri 0,021 bulunmuş olup, istatistiksel farklılık anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Farklı D vitamini konsantrasyonu uygulamalarında, NO miktarındaki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama NO değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup Tablo 18’de gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre (p<0,05);

DMSO, 0,01 ve 0,005 μM D vitamini konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır. 0,001 μM D konsantrasyonu ile bütün D vitamini dozları ve DMSO arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır ($p<0,05$).

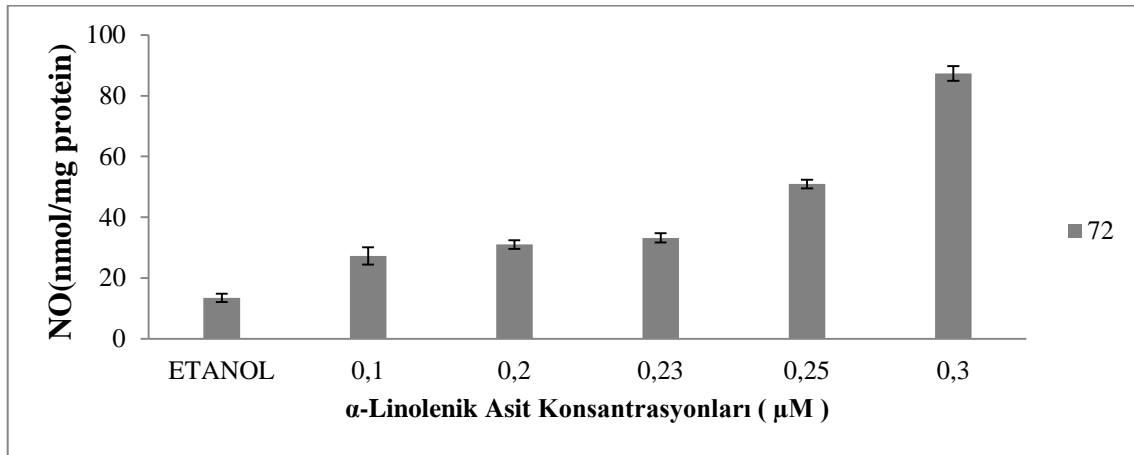
4.5.2. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında NO Analizi

SW480 hücrelerinin α - Linolenik asit (ALA) konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorban değerlerine göre ortalama NO ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama NO ve Standart Sapma olarak Tablo 19 ve Şekil 19'da verilmiştir.

Tablo 19. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon(μM)	NO (nmol/mg protein)
ETANOL	13,50 \pm 1,41 A
0,1	27,30 \pm 2,85 B
0,2	31,10 \pm 1,41 C
0,23	33,20 \pm 1,51 C
0,25	50,90 \pm 1,41 D
0,3	87,30 \pm 2,42 E

*A, B, C, D vb. büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 19. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait NO değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır.

Konsantrasyon için $p < 0,001$ bulunmuş olup, istatistiksel farklılık anlamlı bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça NO miktarında artış olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama NO değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup, Tablo 189'da gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p < 0,05$);

0,2 ve 0,23 μM ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır. Diğer bütün ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. ETANOL ve bütün ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır ($p < 0,05$).

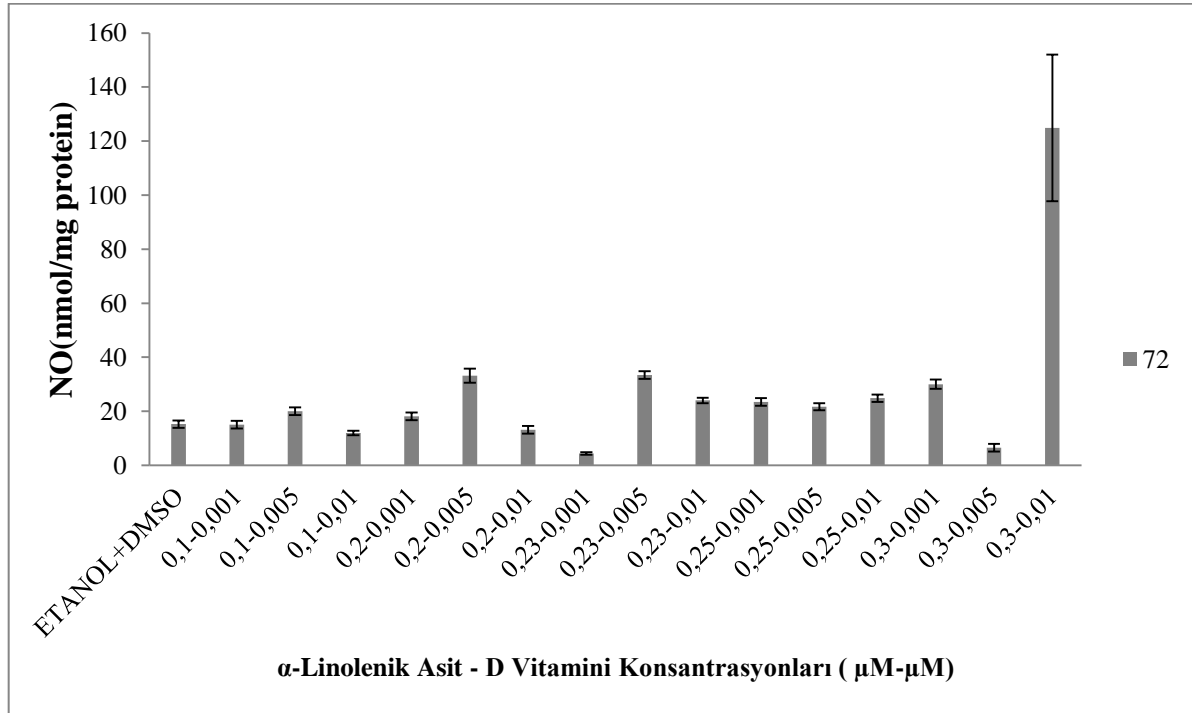
4.5.3. SW480 Hücrelerinin α -Linolenik Asit-D vitamini Konsantrasyonlarında NO Analizi

SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorban değerlerine göre NO ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama NO ve Standart Sapma olarak Tablo 20 ve Şekil 20'de verilmiştir.

Tablo 20. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μM - μM)	NO (nmol/mg protein)		
ETANOL+DMSO	15,2	\pm 1,410	BC
0,1-0,001	15,1	\pm 1,395	BC
0,1-0,005	20,0	\pm 1,410	DE
0,1-0,01	12,0	\pm 0,845	B
0,2-0,001	18,1	\pm 1,410	CD
0,2-0,005	33,2	\pm 2,584	H
0,2-0,01	13,1	\pm 1,410	B
0,23-0,001	4,4	\pm 0,469	A
0,23-0,005	33,4	\pm 1,410	H
0,23-0,01	24,0	\pm 1,014	F
0,25-0,001	23,4	\pm 1,410	F
0,25-0,005	21,6	\pm 1,303	EF
0,25-0,01	24,8	\pm 1,410	F
0,3-0,001	30,0	\pm 1,703	G
0,3-0,005	6,5	\pm 1,410	A
0,3-0,01	124,9	\pm 27,177	J

*A, B, C vb. büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 20. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO değerleri (n=2)

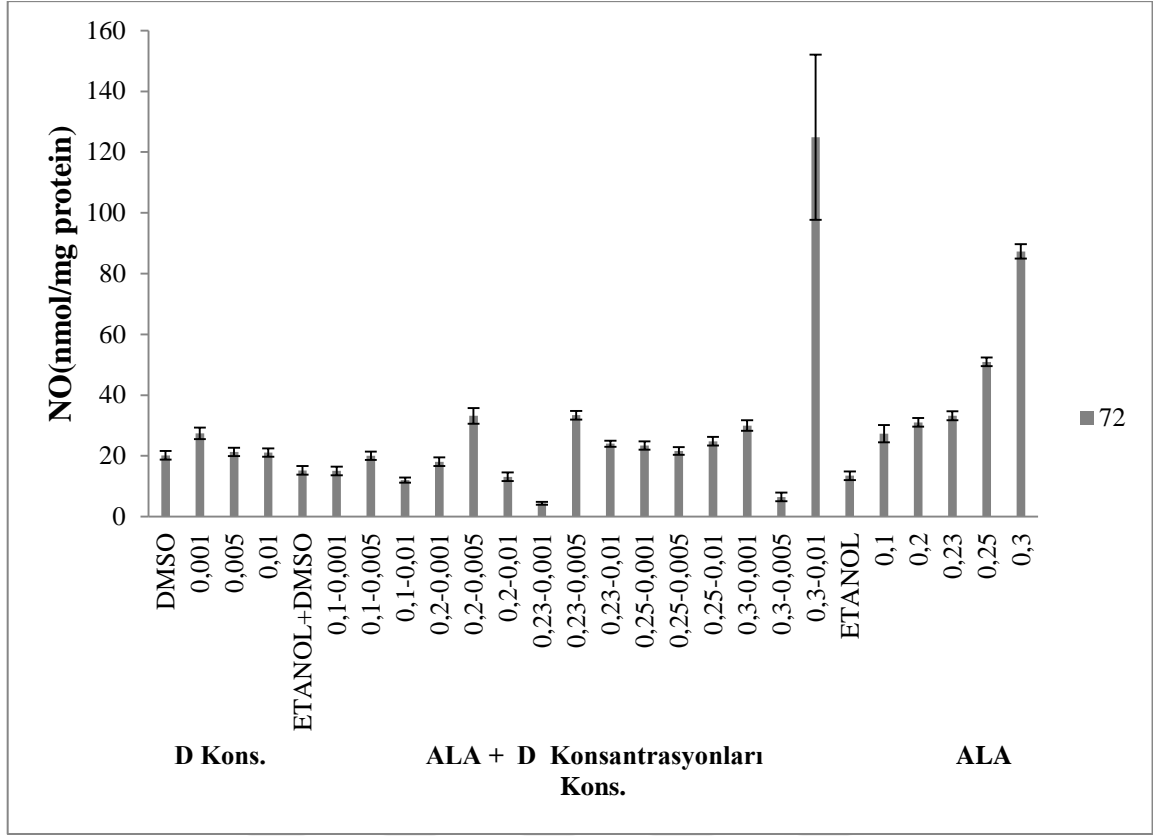
Konsantrasyon grubuna ait ortalama NO değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır. Konsantrasyon için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama NO değerleri için istatistiksel olarak farklar anlamlı bulunmuş olup Tablo 20’de gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p<0,05$);

0,23-0,001 μM - μM konsantrasyonu ile 0,3-0,005 μM - μM konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. ETANOL+DMSO, 0,1-0,01, 0,2-0,01, 0,1-0,001 μM - μM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. ETANOL+DMSO, 0,2-0,001 ve 0,1-0,001 μM - μM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,1-0,005 ve 0,25-0,005 μM - μM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,25-0,005, 0,25-0,001, 0,23-0,01, 0,25-0,01 μM - μM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,2-0,005 ve 0,23-0,005 μM - μM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,3-0,001 μM - μM konsantrasyonu ile bütün ALA+D konsantrasyonları ve ETANOL+DMSO arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. 0,3-0,01 μM - μM konsantrasyonu ile bütün ALA+D konsantrasyonları ve ETANOL+DMSO arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. Diğer bütün konsantrasyonların aralarındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

4.5.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının NO Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması

NO sonuçlarına göre D, ALA+D ve ALA konsantrasyonları karşılaştırılması Şekil 21’de gösterilmektedir.



Şekil 21. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen NO değerleri

0,001 μ M D konsantrasyonunda NO, DMSO kontrol grubuna göre artmış olup, diğer konsantrasyonlarda DMSO kontrol grubu ile aynı düzeydedir. ALA+D konsantrasyonları için düşük ALA konsantrasyonlarında NO, ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre daha az miktarda olup, yüksek ALA konsantrasyonlarında ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre artış göstermektedir. ALA konsantrasyonları için konsantrasyon arttıkça NO değerlerinin artmakta olduğu tespit edilmiştir.

4.6. GPx Analizi

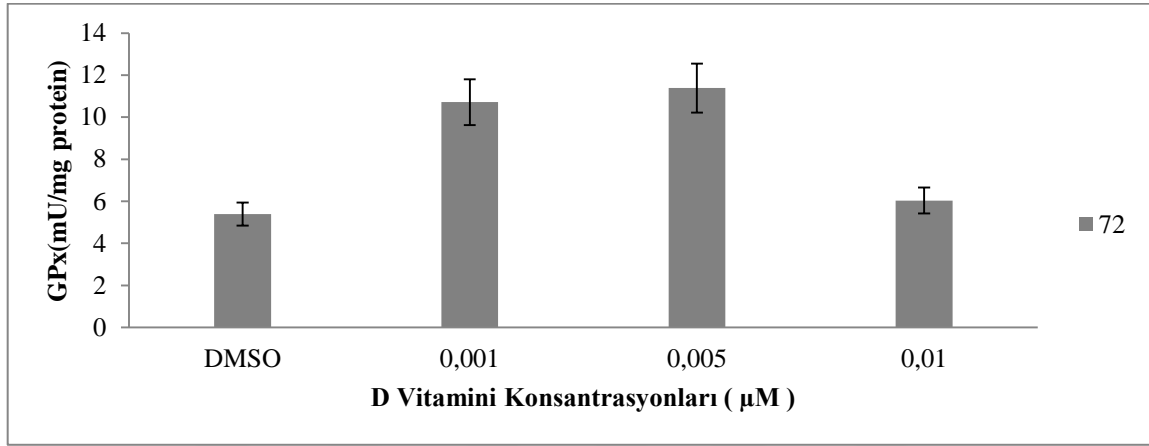
4.6.1. SW480 Hücrelerinin Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında GPx Analizi

SW480 hücrelerinin D vitamini Konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre ortalama GPx ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama GPx ve Standart Sapma olarak Tablo 21 ve Şekil 22'de verilmiştir.

Tablo 21. SW480 hücrelerinin D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μ M)	GPx(mU/mg protein)
DMSO	5,4 \pm 0,5 A
0,001	10,7 \pm 1,1 B
0,005	11,4 \pm 1,2 B
0,01	6,0 \pm 0,6 A

*A, B vb. büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 22. SW480 hücrelerinin D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait GPx değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır. Konsantrasyon için p değeri 0,026 bulunmuştur. Bu değer p<0,05 olup, Farklı konsantrasyon uygulamalarında, GPx miktarındaki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama GPx değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup Tablo 21’de gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre (p<0,05);

DMSO ve 0,01 μ M D vitamini konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,001 ve 0,005 μ M D vitamini konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. DMSO ile 0,001 ve 0,005 μ M D vitamini konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık anlamlıdır. 0,01 μ M D vitamini konsantrasyonu ile 0,001 ve 0,005 μ M D vitamini konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık anlamlıdır. (p<0,05).

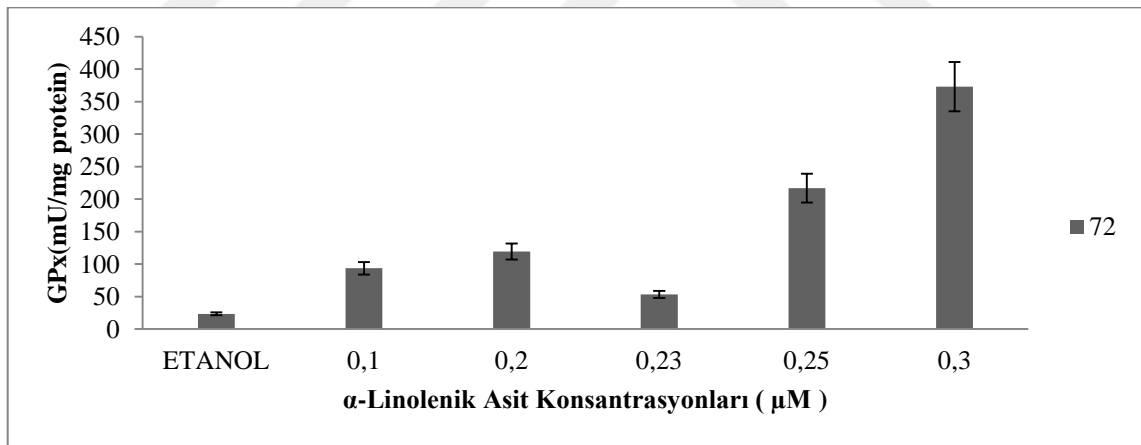
4.6.2. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında GPx Analizi

SW480 hücrelerinin α - Linolenik asit (ALA) konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbands değerlerine göre ortalama GPx ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama GPx ve Standart Sapma olarak Tablo 22 ve Şekil 23'te verilmiştir.

Tablo 22. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon(μ M)	GPx (mU/mg protein)
ETANOL	23,5 \pm 2,4 A
0,1	93,6 \pm 9,5 C
0,2	119,4 \pm 12,2 D
0,23	53,2 \pm 5,4 B
0,25	216,7 \pm 22,1 E
0,3	372,9 \pm 38,0 F

*A,B,C vb. büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 23. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait GPx değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır.

Konsantrasyon için p<0,001 bulunmuş olup, istatistiksel farklılık anlamlı bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça GPx miktarında artış olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir (p<0,001).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama GPx değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup, Tablo 22’de gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p<0,05$);

ETANOL ve bütün ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık anlamlıdır. Bütün ALA konsantrasyonlarının aralarında istatistiksel olarak farklılık anlamlıdır ($p<0,05$).

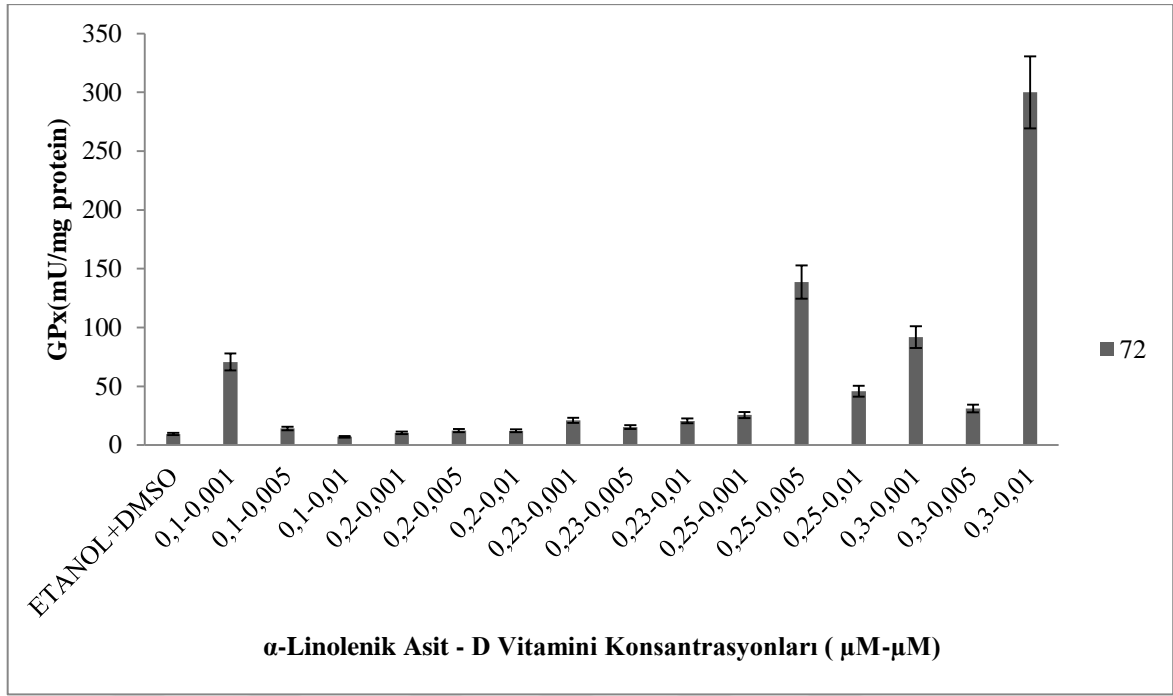
4.6.3. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit-D Vitamini Konsantrasyonlarında GPx Analizi

SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre ortalama GPx ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama GPx ve Standart Sapma olarak Tablo 23, Şekil 24’te verilmiştir.

Tablo 23. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μM - μM)	GPx (mU/mg protein)
ETANOL+DMSO	9,4 \pm 1,0 AB
0,1-0,001	70,7 \pm 7,2 H
0,1-0,005	14,2 \pm 1,4 C
0,1-0,01	7,1 \pm 0,7 A
0,2-0,001	10,4 \pm 1,1 B
0,2-0,005	12,4 \pm 1,3 BC
0,2-0,01	12,1 \pm 1,2 BC
0,23-0,001	21,0 \pm 2,1 D
0,23-0,005	15,3 \pm 1,6 C
0,23-0,01	20,6 \pm 2,1 D
0,25-0,001	25,6 \pm 2,6 E
0,25-0,005	138,6 \pm 14,1 K
0,25-0,01	45,9 \pm 4,7 G
0,3-0,001	91,8 \pm 9,4 J
0,3-0,005	31,1 \pm 3,2 F
0,3-0,01	300,0 \pm 30,6 L

*A, B, C vb. büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 24. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

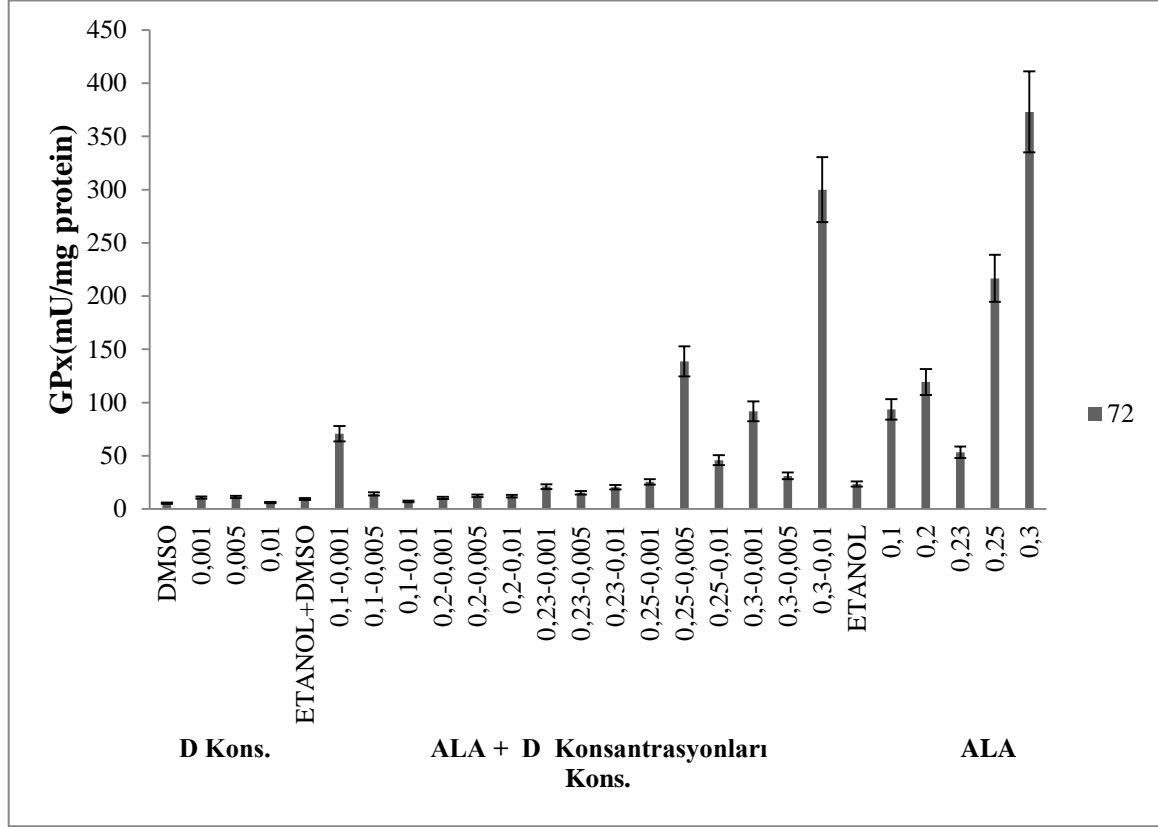
Konsantrasyon grubuna ait ortalama GPx değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır. Konsantrasyon için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Ölüm olan konsantrasyonlarda ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre GPx değerlerinin daha fazla arttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama GPx değerleri için istatistiksel olarak farklar anlamlı bulunmuş olup Tablo 23'te gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p < 0,05$);

0,1-0,01 μM - μM ALA+D konsantrasyonu ile ETANOL+DMSO arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. ETANOL+DMSO, 0,2-0,001, 0,2-0,01, 0,2-0,005 μM - μM ALA+D konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,2-0,01 0,2-0,005, 0,1-0,005 ve 0,23-0,005 μM - μM ALA+D konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,23-0,01 ve 0,23-0,001 μM - μM ALA+D konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. Diğer bütün konsantrasyonların aralarındaki fark anlamlıdır ($p < 0,05$).

4.6.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının GPx Sonuçlarının Karşılaştırılması

GPx sonuçlarına göre D, ALA+D ve ALA konsantrasyonları karşılaştırılması Şekil 25'te gösterilmektedir.



Şekil 25. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen GPx değerleri

D ve ALA+D dozlarında ölüm olmayan konsantrasyonlarda GPx miktarının genellikle kontrol gruplarına göre çok farklı olmadığı tespit edilmiştir. Ölüm olan ALA+D dozlarında ETANOL+DMSO kontrol grubuna GPx değerleri artmaktadır. ALA konsantrasyonları arttıkça GPx değerleri ETANOL kontrol grubuna göre genellikle daha fazla artmaktadır.

4.7. SOD Analizi

4.7.1. SW480 Hücrelerinin Farklı D Vitamini Konsantrasyonlarında SOD Analizi

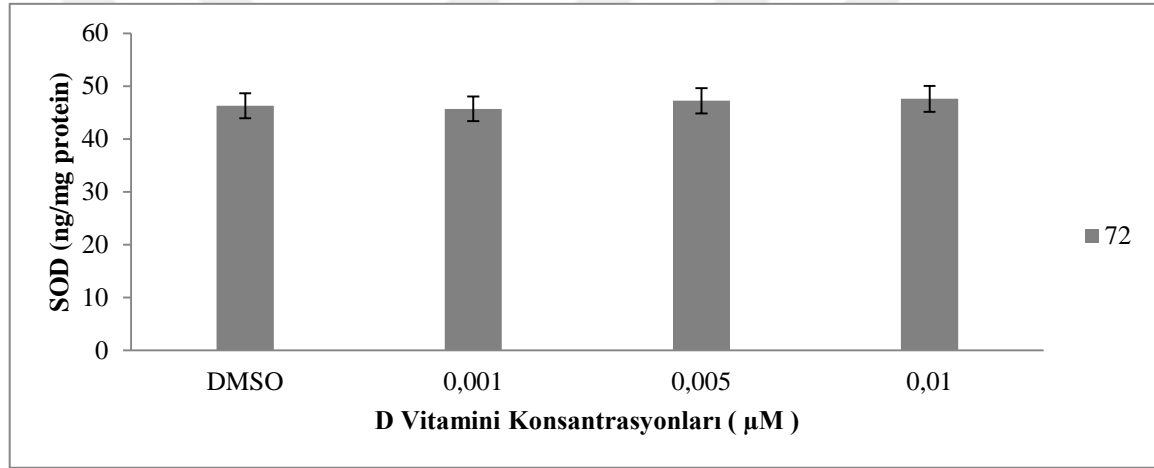
SW480 hücrelerinin D vitamini konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorban değerlerine göre ortalama SOD ve standart sapma değerleri hesaplanmış

olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama SOD ve Standart Sapma olarak Tablo 24 ve Şekil 26’da verilmiştir.

Tablo 24. SW480 hücrelerinin D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μM)	SOD(ng/mg protein)
DMSO	46,0 \pm 2,4 A
0,001	46,0 \pm 2,3 A
0,005	47,0 \pm 2,4 A
0,01	48,0 \pm 2,4 A

**A, B, C, D vb. büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 26. SW480 hücrelerinin D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait SOD değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır. Konsantrasyon için p değeri 0,509 bulunmuştur. Bu değer $p>0,05$ olup, Konsantrasyon grubunun istatistiksel farklılığının anlamlı olmadığı tespit edilmiş olup, Konsantrasyon artışına bağlı olarak SOD değerinde herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Postock analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile Konsantrasyon grupları arasındaki SOD değerleri için farkların tespit edilmesi amaçlanmış olup, Tablo 24’te gösterilmiş olup, konsantrasyon grupları arasında istatistiksel farklılık olmadığı belirlenmiştir.

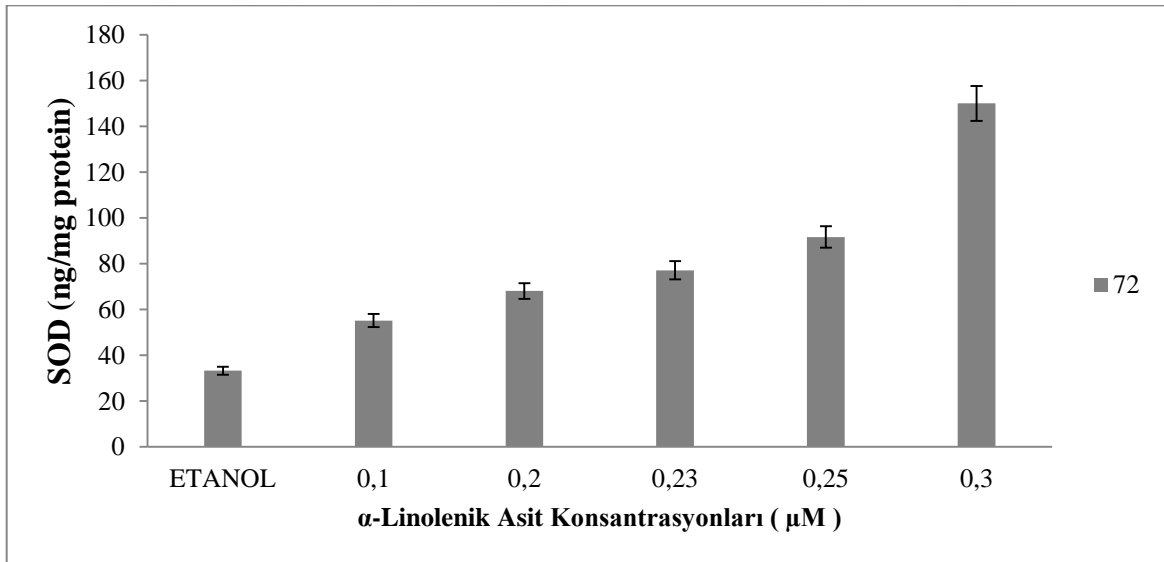
4.7.2. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit Konsantrasyonlarında SOD Analizi

SW480 hücrelerinin α -Linolenik asit (ALA) konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre SOD ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar Ortalama SOD ve Standart Sapma olarak Tablo 25 ve Şekil 27'de verilmiştir.

Tablo 25. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon(μ M)	SOD (ng/mg protein)
ETANOL	33,0 \pm 1,7 A
0,1	55,0 \pm 2,8 B
0,2	68,0 \pm 3,5 C
0,23	77,0 \pm 3,9 D
0,25	92,0 \pm 4,7 E
0,3	150,0 \pm 7,7 F

*A, B, C, D, E vb. büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 27. SW480 hücrelerinin ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD değerleri (n=2)

Konsantrasyon için $p < 0,001$ bulunmuş olup, istatistiksel farklılık anlamlı bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça SOD miktarında artış olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir ($p < 0,001$).

Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama SOD değerleri için istatistiksel olarak farklar anlamlı bulunmuş olup Tablo 25'te gösterilmiştir. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p < 0,05$);

ETANOL kontrol grubu ile bütün ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır. Bütün ALA konsantrasyonlarının aralarında istatistiksel olarak fark anlamlıdır ($p < 0,05$).

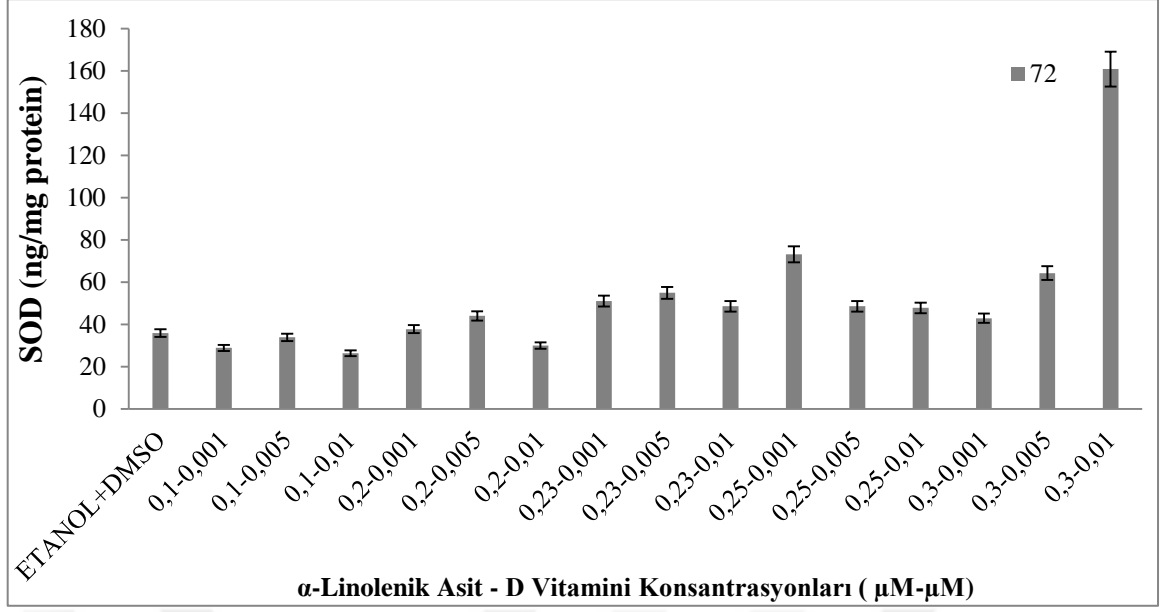
4.7.3. SW480 Hücrelerinin Farklı α -Linolenik Asit+D Vitamini Konsantrasyonlarında SOD Analizi

SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen absorbans değerlerine göre SOD ve standart sapma değerleri hesaplanmış olup, Tek yön varyans analizi (ANOVA) uygulanarak sonuçlar SOD ve Standart Sapma olarak Tablo 26, Şekil 28'de verilmiştir.

Tablo 26. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD \pm Standart Sapma değerleri (n=2)

Konsantrasyon (μM - μM)	SOD(ng/mg protein)
ETANOL+DMSO	36,0 \pm 1,8 CD
0,1-0,001	29,0 \pm 1,5 B
0,1-0,005	34,0 \pm 1,7 C
0,1-0,01	26,0 \pm 1,4 A
0,2-0,001	38,0 \pm 1,9 D
0,2-0,005	44,0 \pm 2,3 E
0,2-0,01	30,0 \pm 1,5 B
0,23-0,001	51,0 \pm 2,6 F
0,23-0,005	55,0 \pm 2,8 G
0,23-0,01	49,0 \pm 2,5 F
0,25-0,001	73,0 \pm 3,7 J
0,25-0,005	49,0 \pm 2,5 F
0,25-0,01	48,0 \pm 2,4 F
0,3-0,001	43,0 \pm 2,2 E
0,3-0,005	64,0 \pm 3,3 H
0,3-0,01	161,0 \pm 8,2 K

**A, B, C, D, E, F vb. büyük harf simgeleri birbirlerinden farklı olan satırların istatistiksel olarak farkı anlamlıdır ($p < 0,05$).



Şekil 28. SW480 hücrelerinin ALA+D uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD değerleri (n=2)

Konsantrasyon grubuna ait ortalama SOD değerleri arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili varyans analizi için F-Testi uygulanmıştır. Konsantrasyon için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Ölüm olan konsantrasyonlarda ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre SOD değerlerinin daha fazla arttığı tespit edilmiştir ($p<0,001$).

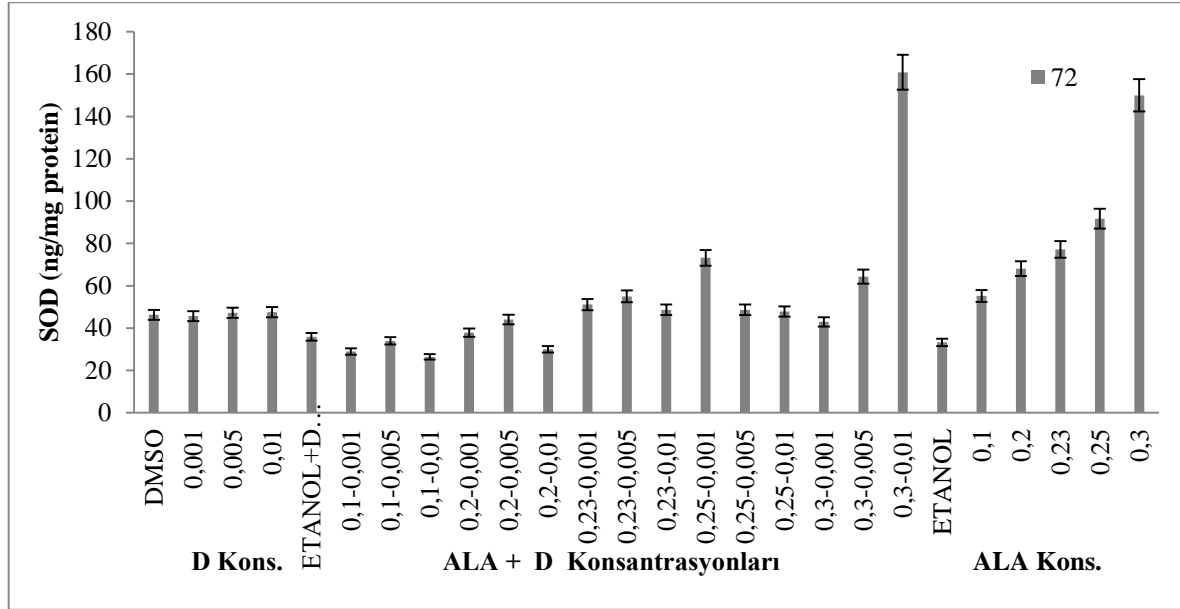
Post-Hoc analizi için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmış, Konsantrasyon grupları arasındaki ortalama SOD değerleri için istatistiksel olarak farklar anlamlı bulunmuş olup Tablo 26'da gösterilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre ($p<0,05$);

0,1-0,001 ve 0,2-0,01 $\mu\text{M}-\mu\text{M}$ ALA+D konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,1-0,005 $\mu\text{M}-\mu\text{M}$ ALA+D konsantrasyonu ile ETANOL+DMSO arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. ETANOL+DMSO ile 0,2-0,001 $\mu\text{M}-\mu\text{M}$ ALA+D konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,3-0,001 ve 0,2-0,005 $\mu\text{M}-\mu\text{M}$ ALA+D konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. 0,25-0,01, 0,23-0,01, 0,25-0,005, 0,23-0,001 $\mu\text{M}-\mu\text{M}$ ALA+D konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. Diğer bütün konsantrasyonların aralarındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

4.7.4. D, ALA+D ve ALA Konsantrasyonlarının SOD sonuçlarına göre Karşılaştırılması

SOD sonuçlarına göre D, ALA+D ve ALA konsantrasyonları karşılaştırılması Şekil 29'da gösterilmektedir.



Şekil 29. SW480 hücrelerinin D, ALA+D ve ALA uygulamaları ile 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen SOD değerleri

D konsantrasyonları için, Konsantrasyon artışına bağlı olarak SOD değerinde herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir. ALA+D konsantrasyonları için ALA'nın düşük konsantrasyonlarında ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre SOD değerlerinin azalmış olduğu, ALA'nın yüksek konsantrasyonlarında ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre SOD değerlerinin daha fazla arttığı tespit edilmiştir. ALA konsantrasyonları için Konsantrasyon arttıkça SOD miktarında artış olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Epidemiyolojik çalışmalar, D vitamini eksikliğinin çeşitli insan kanserleriyle ilişkili olduğunu göstermiş olup, VDR aktif D vitamini metaboliti ile birlikte biyolojik etkilerin çoğunu düzenlemektedir. VDR, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile ince bağırsak ve kolonda yüksek oranda bulunmakta olup, bağırsakta hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında, bağırsak bariyeri işlevinde, doğuştan gelen bağışıklıkta regüle edici etkisi olduğu belirtilmiştir (Jun Sun, 2017).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, VDR proteinine bağlandığında, VDR, dimerizasyon alanlarından retinoik asit reseptörü (RXR) ile birleşir ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR kompleksi oluşur, daha sonra D vitamini hedef gendeki yanıt elementlerine bağlanır. Hedef genlerin promoterlerindeki DNA bağlama alanı yoluyla, bu hedef genlerin ekspresyonunu aktive eder. Genlerin tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) VDR geninde tanımlanmış olup, Bu SNP'lerin kolorektal kansere karşı artan duyarlılık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Touvier ve ark, 2011; Deeb ve ark, 2007).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sinyallemede doku tipi varyasyonlar vardır. VDR ekspresyonu tümör hücresinin önemli bir belirleyicisidir. Kolon tümörleri en yüksek VDR ekspresyonu ile $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tedavisine en çok tepki vermiştir. Ancak VDR'nin downregülasyonunun kolon kanseri hücrelerinde antikanser etkisini azalttığı belirtilmiştir (Deeb ve ark, 2007).

D vitamini doğuştan gelen bağışıklığın düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan bir steroid hormonu olarak tanımlanmıştır. D vitamininin aktivasyonu, iki sıralı hidroksilasyon adımıyla gerçekleşir. İlk adımda karaciğerde 25-hidroksilaz, D_3 vitamini birincil dolaşım veya depolama formu olan $25(\text{OH})\text{D}_3$ formuna dönüştürür. İkinci adımda ise $25(\text{OH})\text{D}_3$ böbreklerde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'e dönüşür. (Zhu ve DeLuca, 2012; Hansdottir ve ark, 2008).

2008 yılında yayınlanan D vitamini ve kanser ilişkili Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın raporunda; $25(\text{OH})\text{D}_3$ düzeyi arttıkça kolorektal kanser düzeyinin azalmakta olduğu belgelenmiştir. Yapılan bir çalışmada $25(\text{OH})\text{D}_3$ 'ün daha yüksek plazma seviyelerinde VDR genine bağlı olarak kolorektal kanser sağkalımında daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Zgaga ve ark, 2014). Bir meta analiz çalışmasında ise 64 çalışmada incelenen 44 165 vakaya göre daha yüksek $25(\text{OH})\text{D}_3$ konsantrasyonları kanserde sağkalım ve ilerlemesiz sağkalımda daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Vaughan-Shaw ve ark, 2017). Yapılan bir başka çalışmada D vitamini yüksek konsantrasyon takviyesinin D vitamini yetersizliği olan yaşlı

kadın hastalarda serum D vitamini düzeyini artırarak, inflamasyonu baskıladığı, antioksidan kapasitesini artırdığı oksidatif stres biyomarkerlerinin artmasıyla ortaya konmuştur (Cavalcante ve ark, 2015).

UT-EC-1 ve UT-EC-3 endometrial adenokarsinoma hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün hücre hattında büyümeyi inhibe ettiği, sitotoksik etkisinin bulunduğu belirlenmiştir (Kuittinen ve ark, 2017).

MCF-7 hücre dizisi ile yapılan *in vitro* bir çalışmada D vitamininin meme dokularında hücre büzülmesi, kromatin ağının yoğunlaşması ve DNA'nın parçalanmasına neden olarak apoptozisin indüksiyonunda önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur (Simboli-Campbell ve ark, 1996). Meme Kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada VDR'nin fonksiyonel ifadesi ve nükleer aktivasyonunun, meme kanserinin önlenmesini sağlayan hedef genin üzerindeki D vitamini yanıt elementine (VDRE) D vitamininin bağlanmasıyla proliferasyonun inhibe ederek proapoptozu uyardığı belirlenmiştir (Iqbal ve Khan, 2017).

Göğüs kanseri hücre dizilerinde yapılan başka bir çalışmada D vitamini reseptörü bulunan hücre dizilerinde, bulunmayanlara oranla kalsitriole ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) duyarlılığın daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ IC₅₀ değerleri göğüs kanseri hücre dizileri için 0,12 μM ile 20 μM 'dan büyük konsantrasyonlara kadar geniş bir aralıkta olduğu belirlenmiş olup, VDR varlığının etkili olduğu tespit edilmiştir (Murray ve ark, 2017).

Yapılan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda farklı kanser türlerinde D vitamininin hücre proliferasyonunun inhibe edilmesinde ve apoptoziste etkileri mevcuttur (O'Kelly ve Koeffler, 2003; Van den Bemd ve Chang 2002; Değişli, 2010).

Apoptozis vücudun kanserden korunma mekanizlarının en önemlilerinden biridir. Apoptozisi artıran veya azaltan besin maddeleri, gıda takviyeleri ve ilaçlar kanser mücadelesinde oldukça önemli olup hücre proliferasyonunun inhibisyonunda etkili olduğu bilinen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en güçlü hormonlardan biri olduğu tespit edilmiştir (Holick 2008).

D Vitamininin uyardığı apoptoz mekanizması tam olarak anlaşılmasına rağmen MCF-7 hücre dizisinde yapılan başka bir çalışmada apoptozun D vitamini aracılığı ile uyarılması sonucu apoptoza neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna sebep olan mitokondriyal bozulma ile korele olduğu kanısına varılmıştır (Narvaez ve ark, 2001).

D vitamininin meme kanseri hücreleri için proapoptotik etkisi olduğu, MCF-7 hücrelerinde, aerobik metabolizma sırasında hücre içi ROS türlerinin artması sonucu SOD gibi ROS'a karşı hücrel savunma sisteminin ana bileşenlerinden birinin ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Ravid ve ark, 1999).

SOD miktarındaki azalmanın, D vitamininin oksidan etkisinin mekanizmalarından biri olabileceği, MCF-7 hücre dizisinde yapılan başka çalışmalarda, SOD'un aşırı ekspresyonu sonucu, MCF-7 hücrelerinin yaralanmasının önlendiği ortaya konmuştur (Doroshov ve ark, 1991; Manna ve ark, 1998).

SOD düzeylerindeki azalmanın, H₂O₂ ve süperoksitler arasındaki dengenin kaymasına neden olup, artan süperoksit seviyeleri, yüksek toksik peroksinitrit oluşturmak için NO ile etkileşerek, artmış oksidatif hasara neden olabileceği ve Fenton reaksiyonu sonucu serbest demir miktarının artması yoluyla hidroksil radikal oluşumunu desteklediği belirlenmiştir (Squadrito ve ark, 1998; Minotti ve ark, 1993).

D vitamininin antioksidan etkileri olduğu, DNA hasarını onarmada farklı mekanizmalarla etkili olduğu tespit edilmiştir (Fleet ve ark, 2012). Yapılan *in vivo* çalışmalarda D vitamininin SOD süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin artışıyla lipid peroksidasyonunu azalttığı belirtilmiştir (Mokhtari ve ark, 2017). Ayrıca 1,25(OH)₂D₃'nin prostat epitel hücreleri ve LNCaP hücrelerinde SOD aktivitesini indüklediği belirlenmiştir (Peehl ve ark, 2004; Lambert ve ark, 2006). Bir çalışmada MCF-7 hücrelerinde 1,25(OH)₂D₃'nin GPx değerini etkilemezken, SCC25 hücrelerinde artırdığı belirtilmiştir (Lin ve ark, 2002). Başka bir çalışmada RWPE1 hücrelerinde 1,25(OH)₂D₃'nin yine GPx miktarını artırdığı bildirilmiştir (Kovalenko ve ark, 2010).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda 1,25(OH)₂D₃ meme kanserinde anti-proliferatif etkisi ve pro-apoptotik faaliyetleri gösterilmiş olup, deneysel çalışmalarda hücrede D vitamini reseptörünün ve 1- α hidroksilazın kolorektal hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir. 1,25(OH)₂D₃ insan kolon adeno ve karsinoma hücrelerinden birincil kültürde oluşturulan insan kolon adenokarsinom türevli hücre hatlarında büyüme ve farklılaşmayı engellediği ortaya konmuştur. Aktif D vitamininin insan kolon kanseri hücresinde D vitamini reseptörlerine bağlanması ile proliferasyonu etkileyen çeşitli genleri düzenleyerek kanser hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir (Simboli-Campbell ve ark 1996).

Yapılan *in vivo* bir çalışmada kolon kanserinde D vitamini düzeyi yeterli ve eksik olan fareler karşılaştırılmış, D vitamini düzeyi yeterli olan farelerde tümör büyümesinin anlamlı olarak daha az olduğu gözlenmiştir (Spina, 2005).

Caco-2, SW1417 ve SW480-ADH kolon kanseri hücrelerinde 1,25(OH)₂D₃ konsantrasyonları kullanılarak yapılan bir çalışmada hücre hatlarının her biri için hücrenin fosfolipit kompozisyonunu etkileyerek hücre proliferasyonunu azaltmakta olduğu belirlenmiştir (Leysens ve ark, 2015).

Sıçanlar kullanılarak yapılan bir çalışmada anjiyotensin II tip 1 reseptör blokerleri ile kombine edilen D vitamini, zamanla oksidatif stresi azaltarak ve böbrek antioksidan kapasitesini artırmış, diyabetik nefropatinin tedavisi üzerinde sinerjik bir etki göstermiştir (Deng ve ark, 2016).

Omega-3 yağ asiti kaynağı olan α -Linolenik Asit (ALA) ile yapılan çeşitli çalışmalarda prostat, meme, mesane kanser hücrelerinin proliferasyonu azaltarak regüle ettiği ortaya konmuştur. HT 29 ve HCT116 ve MCA 38 hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada Omega-3 yağ asidinin hücre proliferasyonunu, adezyonunu ve invazyonunu engellediği ortaya konulmuştur (Chamberland JP 2014; Manson ve ark, 2012). Omega-3 yağ asitlerinin antioksidan etkileri olduğu çeşitli deneysel çalışmalarla da gösterilmiştir (Zararsız ve Ark, 2006; Kuş ve ark, 2008; Stone, 1997).

MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmada farelere ALA zengini bir diyet uygulanmış MCF-7 tümöründe büyümeyi ve çoğalmayı azalttığı gözlenmiştir (Mason-Ennis ve ark, 2016; Chen ve ark, 2007; Saggari ve ark, 2010).

MCF-7 göğüs kanseri hücre dizisinde yapılan başka çalışmalarda ALA'nın metabolitleri olmadan hücre canlılığını azalttığı (LeMay-Nedjelski ve ark, 2018), mitokondriyal apoptoza neden olduğu ortaya konmuştur (Roy ve ark, 2017).

Birkaç meme kanseri dizisi üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda ALA'nın bağımsız etkileri görülebilmiş ve ALA'nın meme kanseri hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir. (Mason-Ennis ve ark, 2016; Wiggins ve ark, 2015; Bardou ve ark, 1996; Grammatikos ve ark, 1994). Bazı çalışmalarda ALA hiçbir etki göstermemiştir (Horia ve ark, 2005).

Sıçanlar üzerinde formaldehit kullanılarak nöronal hasar ile oksidatif stres oluşturulan bir çalışmada, omega-3 yağ asiti kullanılan grupta, kullanılmayanlara göre SOD ve GPx

enzim aktiviteleri artmış ve azalan MDA seviyeleri tespit edilmiş olup, formaldehitin neden olduğu hücresel hasarın azaldığı ve yapısal görünümün kontrol grubundaki sıçanlara benzediği belirlenmiştir. Prefrontal kortekste formaldehit ile indüklenen nöron hasarının omega-3 esansiyel yağ asitleri ile önlendiği saptanmıştır (Zararsız ve ark, 2006).

Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada formaldehit toksitesinin sonucu testislerde meydana gelen oksidatif doku hasarının omega-3 yağ asitleri tarafından engellendiği omega-3 kullanılmayanlara göre SOD ve GPx enzim aktiviteleri artmış ve azalan MDA seviyeleri tespit edilerek biyokimyasal olarak ortaya konmuştur. (Kuş ve ark, 2008)

Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada omega-3 yağ asiti verilen sıçanların böbrek dokusunda oksidatif hasarı önlediği, antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği ve böbrek dokusu üzerinde koruyucu etki gösterdiği, kontrol grubuna göre SOD ve GPx aktivitelerinin artarken, MDA düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir (Gülcen ve ark, 2012)

Tip I diyabet hastası sıçan embriyoları üzerinde yapılan başka bir çalışmada düşük ALA konsantrasyonlarının lipit peroksidasyonunda yüksek konsantrasyonlardan daha etkili olduğu tespit edilmiş olup, MDA düzeylerinin, düşük ALA konsantrasyonlarında daha düşük olduğu ortaya konmuştur (Chirino-Galindo ve ark, 2017).

Omega-3 kaynağı olan balık yağının antioksidatif etkileri nedeniyle kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olduğu, hücre büyümesini ve canlılığını inhibe ettiği belirtilmiştir. (Silva ve ark, 2015)

MCF-7, BT-474, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada ALA'nın göğüs kanseri hücre dizilerinin büyümesini engellediği ortaya konmuştur (Wiggins ve ark, 2015).

HT-29 kolon kanseri hücre dizisinde yapılan bir çalışmada ALA'nın hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Serini ve ark, 2018).

Literatür taraması sonucunda genel olarak D ve ALA için kanser hücre proliferasyonunu azalttıkları, % canlılığı düşürerek sitotoksik etki yaptıkları ve proapoptotik etkileri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca D vitamininin etkisinin hücredeki VDR düzeyine bağlı olduğu tespit edilmiştir. D vitamini ile yapılan bazı çalışmalarda D konsantrasyonlarının oksidan etkileri için SOD miktarını azaltarak, NO oluşumunu desteklediği ve lipit peroksidasyonunu artırdığı lipit peroksidasyonu son ürünü olan MDA miktarındaki artış ile

belirlenmiştir (Doroshov ve ark, 1991; Squadrito ve ark, 1998; Minotti ve ark, 1993). Buna karşılık yapılan başka çalışmalarda ise D vitamininin antioksidan etkileri olarak, SOD (Mokhtari ve ark, 2017; Peehl ve ark, 2004; Lambert ve ark, 2006) ve GPx'in (Kovalenko ve ark, 2010) arttığı çalışmalar ile GPx düzeyinin değişmediği (Lin ve ark, 2002) çalışmalar mevcuttur.

Omega-3 yağ asitleri ile yapılan çeşitli *in vivo* çalışmalarda oluşan oksidatif strese karşılık SOD ve GPx enzim aktiviteleri artmış ve azalan MDA seviyeleri tespit edilmiştir (Zararsız ve ark, 2006; Mason-Ennis ve ark, 2016; Wiggins ve ark, 2015; Bardou ve ark, 1996; Grammatikos ve ark, 1994; Kuş ve ark, 2008; Gülçen ve ark, 2012).

Sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada düşük ALA ile beslenmeye kıyasla, yeterli ALA veya EPA + DHA ile takviyeli diyetlerde, serebrum MDA içeriğini etkilenmedi, fakat karaciğerde MDA içeriğini arttığı, Uterinde MDA düzeyinin EPA + DHA diyetinde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca yeterli ALA veya EPA + DHA ile takviyeli diyetlerde, karaciğer ve uterus SOD2 aktivitesini artırırken, sadece EPA + DHA ile takviyeli diyetinde, serebrumda SOD2 aktivitesini arttırdığı, SOD1, CAT ve GPx aktiviteleri ALA veya EPA + DHA takviyesi ile değişmediği tespit edilmiş olup, SOD, GPx ve MDA aktivitelerinin hücresel düzeyde spesifik olduğu söylenebilir (Garrel ve ark, 2012).

Bununla birlikte yapılan farklı çalışmalarda diyabette organizmanın antioksidan savunma sistemini oluşturan enzimler oksidatif stres karşısında inaktive olduğu çalışmalar (Seven ve ark, 2004; Kakkar ve ark, 1995) mevcut olup, MDA düzeyleri yükselirken SOD ve GPx düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. Buna karşılık diyabetin ileri aşamalarında antioksidan enzim aktivitelerinin, MDA, SOD ve GPx düzeylerinin arttığı belirlenen çalışmalarla (Dinçer ve ark, 2002; Yıldırım ve Büyükbingöl, 2002) birlikte diyabette MDA düzeyi artarken, SOD düzeyinin azalıp, GPx düzeyinin değişmediği (Sadi G ve Sadi Ö, 2011) çalışmalarda vardır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada içme suyuyla bakır verilerek oksidatif stres yaratılmış ölçülen MDA ve SOD seviyelerinin arttığı tespit edilirken (Toplan ve ark, 2003; Sansinanea ve ark, 1998; Ossola ve ark, 1997), başka bir çalışmada sıçanlarda bakır yüklemesi sonucu SOD aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Zhang ve ark, 2000). Bu bağlamda yapılan çeşitli çalışmalarda elde edilen sonuçlar oksidatif stres oluşumunda benzer çalışmalarda farklı sonuçlar bulunabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada öncelikle çeşitli D, ALA+D ve ALA konsantrasyonlarının SW480 hücrelerinin canlılığı üzerinde etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla WST-1 testi yapılmıştır. WST-1 analizinde saptanan bulgular Annexin V analizi ile desteklenmiştir. Analiz sonuçlarına göre;

WST-1 testinde, SW480 hücre hattı üzerine 0,001, 0,005 ve 0,01 μM D konsantrasyonlarının ortalama canlılık üzerine etkisi incelendiğinde çalışmada uygulanan en yüksek D konsantrasyonu olan 0,01 μM D konsantrasyonu için 72 saat sonrasında elde edilen ortalama Canlılık değeri % 77,10 olup, IC_{50} değeri tespit edilememiştir. D vitamini konsantrasyonları belirlenirken yapılan WST-1 denemelerinde kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 1 μM konsantrasyonunda dahi IC_{50} değeri tespit edilememiştir. Konsantrasyon grubu için istatistiksel farklılığının anlamlı olduğu tespit edilmiş olup, Konsantrasyon arttıkça hücre canlılığı azalmaktadır ($p<0,05$). Shabahang ve ark (1993) tarafından SW480 hücre dizisinde VDR miktarının orta düzeyde olduğu belirlenmiş olup, Deep ve ark (2007) ve Murray ve ark (2017) hücredeki VDR miktarının D vitamininin etki düzeyini belirlediğini bildirmişlerdir. D vitamininin SW480 hücre canlılığındaki ve proliferasyonundaki azalmaya etkisinin düşük olması, VDR miktarının orta düzeyde olması ile açıklanabilir. Annexin V testi sonuçlarına göre; DMSO kontrol grubunda yaşam oranı % 89,55 iken, 0,01 μM konsantrasyonu için % 62,60 bulunmuştur. DMSO kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evreleri değerinin % 2,75'ten % 33,00'a çıktığı tespit edilmiş, toplam ölüm oranı % 36,95 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar literatürle (Murray ve ark, 2017; O'Kelly ve Koeffler, 2003; Van den Bemd ve Chang 2002; Değişli, 2010; Narvaez ve ark, 2001) uyumlu olup, D vitamini konsantrasyonları arttıkça hücre proliferasyonu azalmakta olduğu fakat D vitamininin SW480 hücre dizisi üzerinde hücre proliferasyonunun inhibisyonunda etki düzeyinin düşük olduğu, D vitamininin erken apoptotik etkisi olduğu tespit edilmiştir.

SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrası WST-1 testinde elde edilen verilere göre; IC_{50} konsantrasyonu 0,25 μM olup, inkübasyon süresi 72 saattir. Saat*Konsantrasyon interaksyonu için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğunu belirlenmiştir ($p<0,05$). Konsantrasyon miktarı arttıkça ve inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak hücre canlılığı ve dolayısıyla hücre proliferasyonu ETANOL kontrol grubuna göre daha fazla azalmaktadır ($p<0,05$). SW480 hücrelerinin ALA konsantrasyonları ile muamelesinde apoptoz ölçümü için ETANOL kontrol grubu ile IC_{50}

konsantrasyonu olan 0,25 μM ALA konsantrasyonu için Annexin V analizi sonucunda, ETANOL kontrol grubunda yaşam oranı % 90,50 iken, 0,25 μM konsantrasyonu için % 29,95 bulunmuştur. ETANOL kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evreleri değerinin % 4,60'dan % 67,25'e çıktığı tespit edilmiş ve toplam ölüm oranı % 70,05 olarak bulunmuştur. Sonuçlar literatürle (LeMay-Nedjelski ve ark, 2018; Roy ve ark, 2017; Mason-Ennis ve ark, 2016; Wiggins ve ark, 2015; Bardon ve ark, 1996; Grammatikos ve ark, 1994) uyumlu olup, ALA konsantrasyonları arttıkça hücre proliferasyonu azalmakta olup, ALA'nın erken apoptotik etkisi olduğu belirlenmiştir.

WST-1 analizi sonuçlarına göre; SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit+D vitamini konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrası elde edilen verilere göre; IC_{50} konsantrasyonu 0,25-0,01 μM - μM olup, inkübasyon süresi 72 saattir. Saat*Konsantrasyon interaksiyonu için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğunu belirlenmiştir. Konsantrasyon miktarı arttıkça ve inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak hücre canlılığı ve dolayısıyla hücre proliferasyonu ETANOL kontrol grubuna göre daha fazla azalmaktadır ($p < 0,05$). SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile muamelesinde apoptoz ölçümü için ETANOL+DMSO kontrol grubu ile IC_{50} konsantrasyonu olan 0,25-0,01 μM - μM ALA+D konsantrasyonu için Annexin V analizi sonuçlarına göre; ETANOL+DMSO kontrol grubunda yaşam oranı % 92,90 iken, 0,25-0,01 (μM - μM) ALA+D konsantrasyonu için % 48,70 bulunmuştur. ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin geç evreleri değerinin % 3,65'ten, % 29,10'a çıktığı tespit edilmiştir. ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evreleri değerinin % 2,70'den, % 19,25'e çıktığı tespit edilmiş, toplam ölüm oranı % 48,35 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada D, ALA+D ve ALA konsantrasyonlarının SW480 hücrelerinin toplam protein miktarına etkisi 72 saatlik inkübasyonlar sonunda BCA Toplam Protein Testi ile belirlenmiş olup, konsantrasyon arttıkça hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile paralel olarak protein miktarı azalmaktadır. Toplam protein miktarları için D, ALA+D ve ALA konsantrasyonları için istatistiksel farklılık anlamlıdır ($p < 0,05$).

ALA+D konsantrasyonları bir arada kullanıldığında özellikle düşük ALA konsantrasyonları (0,1-0,001, 0,1-0,005, 0,1-0,01, 0,2-0,001, 0,2-0,005, 0,2-0,01 μM - μM) için toplam protein miktarında ve hücre proliferasyonunda D ve ALA konsantrasyonlarından farklı olarak, ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre artış gözlenmektedir. Bu bağlamda, çalışmada ALA+D konsantrasyonları için düşük ALA konsantrasyonlarında (0,1-0,001,

0,1-0,005, 0,1-0,01, 0,2-0,001, 0,2-0,005, 0,2-0,01 μM - μM) hücre proliferasyonunu desteklediği, sitotoksik etki göstermediği belirlenmiş olup, D ve ALA konsantrasyonlarının bir arada kullanılmasının sitotoksisite üzerinde sinerjik bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca ALA+D konsantrasyonlarında ALA'nın hücreler üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

SW480 hücre dizisi D, ALA ve ALA+D konsantrasyonları ile 72 saatlik muamelesi sonrasında elde edilen hücre görüntülerine göre;

D vitamini konsantrasyonlarında; Hücre sayısı Konsantrasyon arttıkça azalmakta olup, konsantrasyon artışı ile birlikte hücrelerin morfolojik yapısındaki bozulmalar hücre genişlemesi şeklindedir. ALA ve ALA+D konsantrasyonlarında ise, D konsantrasyonlarından farklı olarak, konsantrasyon artışı ile birlikte hücrelerin morfolojik yapısındaki bozulmalar hücrelerin uzaması şeklinde olup, hücre miktarının konsantrasyon arttıkça azalmakta olduğu tespit edilmiştir. ALA+D ve ALA konsantrasyonları için hücrelerin morfolojik yapısının bozulmasındaki benzerlik ALA+D konsantrasyonlarında ALA'nın SW480 hücreleri üzerinde daha etkin olduğu desteklemektedir.

Çalışmada D, ALA+D ve ALA uygulaması sonucu kanser hücrelerinde oluşabilecek oksidatif hasarı belirleyebilmek için NO ve lipit peroksidasyon son ürünü MDA tayini yapıldı. Oluşan oksidatif strese karşı gelişebilecek olan antioksidan savunmayı gösterebilmek için SOD ve GPx düzeyleri belirlendi.

Çalışmada D vitamini konsantrasyonlarında antioksidan aktivite parametreleri incelendiğinde;

MDA analizi sonuçlarına göre; Farklı konsantrasyon uygulamalarında, MDA miktarındaki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). 0,001 ve 0,01 μM konsantrasyonları için MDA değeri DMSO kontrol grubuna göre artmış, 0,005 μM konsantrasyonunda ise azalmıştır.

NO analizi sonuçlarına göre; Farklı konsantrasyon uygulamalarında, NO miktarındaki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). 0,001 μM konsantrasyonu için NO değeri DMSO kontrol grubuna göre artmıştır, 0,005 ve 0,01 μM konsantrasyonunda ise DMSO kontrol grubu ile yaklaşık olarak aynı miktardadır.

GPx analizi sonuçlarına göre; Farklı konsantrasyon uygulamalarında, GPx miktarındaki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). 0,001 ve 0,005 μM konsantrasyonu için GPx değeri DMSO kontrol grubuna göre konsantrasyon artışına bağlı artmıştır, 0,01 μM konsantrasyonunda ise 0,005 μM konsantrasyonuna göre daha az miktarda olup, DMSO kontrol grubundan daha yüksek miktardadır.

SOD analizi sonuçlarına göre; Konsantrasyon grubunun istatistiksel farklılığının anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Konsantrasyon artışına bağlı olarak DMSO kontrol grubuna göre SOD değerlerinde herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir.

0,001 μM D vitamini konsantrasyonu için, DMSO kontrol grubuna göre MDA, NO ve GPx miktarlarının arttığı, SOD miktarının değişmediği belirlenmiş olup, 0,005 μM D vitamini konsantrasyonu için, DMSO kontrol grubuna göre GPx miktarının arttığı, MDA miktarının azaldığı ve NO ve SOD miktarının değişmediği belirlenmiştir. 0,01 μM D vitamini konsantrasyonu için DMSO kontrol grubuna göre GPx ve MDA miktarlarının arttığı NO ve SOD miktarının değişmediği belirlenmiştir. D vitamininin 0,001 μM konsantrasyonu için hücrede oksidatif stres oluşması nedeniyle MDA ve NO düzeylerinin DMSO kontrol grubuna göre artmış olması ve oksidatif strese mukavemet göstermek için antioksidan savunma sistemi nedeniyle GPx miktarının DMSO kontrol grubuna göre artmış olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte SOD düzeyinde DMSO kontrol grubuna göre değişiklik olmamıştır. SOD miktarının değişmemesi nedeniyle çalışmada, süper oksit anyon radikalının D vitamini uygulamalarında üretilmediği düşünülebilir. 0,005 ve 0,01 μM D vitamini konsantrasyonu için MDA, NO, düzeylerinin 0,001 μM D vitamini konsantrasyonuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiş olup, indüklenen GPx antioksidan enziminin MDA ve NO miktarlarını azalmasına neden olduğu düşünülebilir. Bu bulgulara göre, D vitamininin SW480 hücre dizisinde lipit peroksidasyonunu artırdığı ve antioksidan savunmada, GPx enzim aktivitesinin savunma sistemi olarak geliştiği, oksidatif stres 0,001 μM konsantrasyonda maksimum düzeylerde iken 0,005 ve 0,01 μM konsantrasyonlarda GPx aktivitesinin NO aktivitesini DMSO kontrol seviyesine çektiği MDA seviyesinin ise, GPx etkisi ile azaldığı, fakat 0,01 μM D vitamini konsantrasyonunda DMSO kontrol grubuna göre MDA ve GPx aktivitelerinin daha yüksek miktarda oldukları, buna karşılık SOD düzeyinde değişiklik olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmada ALA konsantrasyonlarında antioksidan aktivite parametreleri incelendiğinde;

Konsantrasyon arttıkça MDA, NO, GPx ve SOD düzeylerinde ETANOL kontrol grubuna göre daha fazla artma olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p<0,001$).

ALA'nın hücrede oksidatif stres oluşması nedeniyle MDA ve NO düzeylerinin ETANOL kontrol grubuna göre konsantrasyon artışıyla artmış olduğu ve buna karşılık oksidatif strese mukavemet göstermek için antioksidan savunma sistemi nedeniyle SOD ve GPx aktivitelerinin ETANOL kontrol grubuna göre artmış olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları dikkate alındığında maksimum MDA ve NO artışına göre ($0,3\mu\text{M}$), $0,25\mu\text{M}$ IC₅₀ ALA konsantrasyonu için oluşan orta düzeyde oksidatif strese karşılık, antioksidan savunma sistemi nedeniyle SOD ve GPx miktarının ETANOL kontrol grubuna göre orta düzeyde artmış olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte MDA, NO, SOD ve GPx analizinde maksimum değerler hücre canlılığının % 13,7 olarak tespit edildiği $0,3\mu\text{M}$ ALA konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu konsantrasyonda SOD ve GPx değerlerinin artmaya devam etmesi hücrelerin metabolik aktivitesinin devam ettiğini, fakat MDA ve NO değerlerinin düşmemesi hücrelerin apoptoza doğru gitmekte olduğunu göstermektedir. Garrel ve ark (2012) tarafından yapılan *in vivo* bir çalışmada sıçan beyin, karaciğer ve uterus MDA, SOD ve GPx değerlerin organa göre spesifik olarak değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çeşitli benzer çalışmalarda oksidatif stres oluşumunda MDA, NO, GPx ve SOD düzeyi sonuçlarının farklı bulunabileceğini belirlenmiş olup (Seven ve ark, 2004; Kakkar ve ark, 1995; Sadi G ve Sadi Ö, 2011; Zhang ve ark, 2000), oksidatif stres karşısında MDA, SOD ve GPx değerlerinin birlikte arttığı çalışmalar da vardır (Dinçer ve ark, 2002; Yıldırım ve Büyükbingöl, 2002; Toplan ve ark, 2003; Sansinanea ve ark, 1998; Ossola ve ark, 1997).

Çalışmada ALA+D konsantrasyonlarında antioksidan aktivite parametreleri incelendiğinde;

Farklı Konsantrasyon uygulamalarında MDA, NO, GPx ve SOD düzeyleri için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). ALA'nın düşük konsantrasyonları ($0,1-0,001$, $0,1-0,005$, $0,1-0,01$, $0,2-0,001$, $0,2-0,005$, $0,2-0,01\mu\text{M}-\mu\text{M}$) için ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, ALA'nın yüksek konsantrasyonlarında ($0,23-0,001$, $0,23-0,005$, $0,23-0,01$, $0,25-0,001$, $0,25-0,005$, $0,25-0,01$, $0,3-0,001$, $0,3-0,005$, $0,3-0,01\mu\text{M}-\mu\text{M}$) ise ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde olduğu, $0,3-0,01\mu\text{M}-\mu\text{M}$ konsantrasyonunda ise MDA, NO, GPx ve SOD'un maksimum düzeye ulaştıkları belirlenmiş olup, bu konsantrasyonda SOD ve GPx değerlerinin artmaya devam etmesi hücrelerin metabolik aktivitesinin devam ettiğini, fakat MDA ve NO

değerlerinin düşmemesi hücrelerin apoptoza doğru gitmekte olduğunu göstermektedir. Çalışma sonuçları dikkate alındığında maksimum MDA ve NO artışına göre (0,3-0,01 μM - μM), 0,25-0,01 μM - μM IC_{50} ALA+D konsantrasyonu için oluşan orta düzeyde oksidatif strese karşılık, antioksidan savunma sistemi nedeniyle SOD ve GPx miktarının ETANOL kontrol grubuna göre orta düzeyde artmış olduğu tespit edilmiştir. ALA'nın düşük konsantrasyonları için protein miktarı ve hücre canlılığındaki artışa paralel olarak MDA, NO, GPx ve SOD düzeylerinde azalma olduğu ve ALA'nın yüksek konsantrasyonlarında ise hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve protein miktarındaki azalışa paralel olarak MDA, NO, GPx ve SOD düzeylerinde artma olduğu tespit edilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada α -Linolenik asit ve D vitamininin hücre proliferasyonu, apoptoz ve antioksidan etkileri SW480 insan kolon kanser hücre dizisi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada ayrıca ALA+D konsantrasyonları kullanılarak α -Linolenik asit ve D vitamininin birlikte sinerjik bir etki gösterip göstermediği belirlenmiştir.

SW480 hücre dizisi üzerinde D vitamininin etkisi; D vitamini konsantrasyonları arttıkça hücre proliferasyonu ve toplam protein miktarı azalmakta olduğu ve istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). Çalışmada D vitamini konsantrasyonlarında antioksidan aktivite parametreleri incelendiğinde, farklı konsantrasyon uygulamalarında, MDA, NO ve GPx miktarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). SOD analizi için, Konsantrasyon grubunun istatistiksel farklılığının anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte $0,001\mu\text{M}$ D vitamini konsantrasyonu için, DMSO kontrol grubuna göre MDA, NO ve GPx miktarlarının arttığı ve MDA ve NO'nun maksimum düzeye ulaştığı ve $0,005$ ve $0,01\mu\text{M}$ konsantrasyonlarda GPx aktivitesi nedeniyle MDA aktivitesinin azaldığı ve beraberinde NO aktivitesinin DMSO kontrol seviyesine kadar azaldığı, buna karşılık SOD düzeyinde değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Annexin V testi sonuçlarına göre; Toplam ölüm oranı % 36,95 olarak hesaplanmış olup, D vitamininin erken apoptotik etkisi olduğu tespit edilmiştir.

SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit konsantrasyonları için IC_{50} konsantrasyonu $0,25\mu\text{M}$ olup, inkübasyon süresi 72 saattir. Konsantrasyon miktarı arttıkça ve inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak hücre canlılığı ve dolayısıyla hücre proliferasyonu ETANOL kontrol grubuna göre daha fazla azalmakta olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). Çalışmada ALA konsantrasyonlarında antioksidan aktivite parametreleri incelendiğinde, Konsantrasyon arttıkça protein miktarındaki azalışa paralel olarak MDA, NO, GPx ve SOD düzeylerinde ETANOL kontrol grubuna göre daha fazla artma olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). SW480 hücrelerinin ALA konsantrasyonları ile muamelesinde apoptoz ölçümü için Annexin V analizi sonucunda, IC_{50} konsantrasyonu olan $0,25\mu\text{M}$ ALA konsantrasyonu için toplam ölüm oranı % 70,05 olarak bulunmuştur olup, ALA'nın erken apoptotik etkisi olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları dikkate alındığında maksimum MDA, NO, SOD ve GPx artışına göre ($0,3\mu\text{M}$), $0,25\mu\text{M}$ IC_{50} ALA konsantrasyonu için oluşan orta düzeyde oksidatif strese karşılık, antioksidan savunma sistemi nedeniyle SOD ve

GPx miktarının ETANOL kontrol grubuna göre orta düzeyde artmış olduğu tespit edilmiştir. Maksimum konsantrasyonda SOD ve GPx değerlerinin artmaya devam etmesi hücrelerin metabolik aktivitesinin devam ettiğini, fakat MDA ve NO değerlerinin düşmemesi hücrelerin apoptoza doğru gitmekte olduğunu göstermektedir.

SW480 hücrelerinin α -Linolenik Asit+D vitamini konsantrasyonlarında; IC₅₀ konsantrasyonu 0,25-0,01 (μ M- μ M) olup, inkübasyon süresi 72 saattir. Konsantrasyon miktarı arttıkça ve inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak canlılık ve dolayısıyla hücre proliferasyonu ETANOL kontrol grubuna göre daha fazla azalmaktadır ($p<0,05$). Çalışmada ALA+D konsantrasyonlarında antioksidan aktivite parametreleri incelendiğinde, farklı Konsantrasyon uygulamalarında MDA, NO, GPx ve SOD düzeyleri için istatistiksel farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). SW480 hücrelerinin ALA+D konsantrasyonları ile muamelesinde apoptoz ölçümünde Annexin V analizi sonucunda IC₅₀ konsantrasyonu olan 0,25-0,01 (μ M- μ M) ALA+D konsantrasyonu için toplam ölüm oranı % 48,35 olarak tespit edilmiş olup, D ve ALA konsantrasyonlarında farklı olarak erken ve geç apoptoz belirlenmiştir. ALA+D konsantrasyonları bir arada kullanıldığında özellikle düşük ALA konsantrasyonları (0,1-0,001, 0,1-0,005, 0,1-0,01, 0,2-0,001, 0,2-0,005, 0,2-0,01 μ M- μ M) için toplam protein miktarında ve hücre proliferasyonundaki ETANOL+DMSO kontrol grubuna göre artışa paralel olarak, MDA, NO, SOD ve GPx aktiviteleri de azalmaktadır.

Sonuç olarak, D vitamininin SW480 hücre dizisi üzerinde hücre proliferasyonunun inhibisyonunda etki düzeyinin düşük olduğu ve GPx aktivitesini DMSO kontrol grubuna göre artırırken, SOD aktivitesinde değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. ALA ve ALA+D konsantrasyonlarının SW480 hücreleri üzerinde gerçekleşen hücre ölümlerinde ALA konsantrasyonları arttıkça, MDA, NO, SOD ve GPx aktiviteleri artarken, hücre proliferasyonu ve protein miktarı azalmaktadır. MDA ve NO aktivitelerindeki artış oksidatif stres oluştuğunu göstermekte olup, GPx ve SOD aktivitelerinin de artması antioksidan savunma sisteminin IC₅₀ konsantrasyonlarında etkili olabildiğini, daha yüksek konsantrasyonlarda ise SOD ve GPx aktivitelerinin MDA, NO aktiviteleri ile birlikte maksimum düzeye ulaştığı, fakat 0,3 μ M ALA ve 0,3-0,01 μ M- μ M ALA+D konsantrasyonlarında apoptozu engelleyemediği belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, ALA ve ALA+ D konsantrasyonlarında apoptotik etkinin MDA ve NO artışı nedeniyle oksidatif stres kaynaklı olabileceği düşünülebilir. Buna karşılık antioksidan savunma sisteminin kontrol gruplarına göre artan GPx ve SOD aktivitesiyle ALA ve ALA+D IC₅₀ konsantrasyonlarında etkili olması nedeniyle ALA ve

ALA+D konsantrasyonlarının antioksidan etkileri olabileceği de söylenebilir. Ayrıca D ve ALA konsantrasyonlarının bir arada kullanılmasının sitotoksosite üzerinde sinerjik bir etkisi olmadığı tespit edilmiş olup, hatta ALA+D konsantrasyonları için düşük ALA konsantrasyonlarında toplam protein miktarını, hücre canlılığını ve proliferasyonunu artırdığı ve beraberinde MDA, NO, SOD ve GPx aktivitelerini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca ALA+D konsantrasyonlarında ALA'nın hücreler üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Farklı hücre dizilerinde yapılan farklı çalışmalarda aynı konsantrasyonlar aynı sonuçları vermemektedir. Bu bağlamda, farklı kanser hücre dizilerinde, farklı D, ALA+D ve ALA konsantrasyonlarında çalışmalar yapılabilir. D vitamini eksikliğinde; D vitamininin toksik konsantrasyonları ile ALA konsantrasyonları birlikte kullanılarak çeşitli klinik ve *in vivo* çalışmalar yapılabilir. Ayrıca çalışmada ALA+D konsantrasyonları için düşük ALA konsantrasyonlarında hücre canlılığını ve proliferasyonunu artırdığı tespit edilmiş olup, yara iyileşmesi gibi hücre proliferasyonunun önemli olduğu çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Akkoyun HT, Bayramoğlu M, Ekin S, Çelebi F.** D Vitamini ve Metabolizma için nemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2014, 9(3), 213-219.
- Akpınar G.** Kolon Kanserinde Apolipoprotein E (apo E) Gen Polimorfizminin Araştırılması, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli 2006, 99.
- Aleksandrova K, Jenab M, Leitzmann M, Bueno-de-Mesquita B, Kaaks R, Trichopoulou A, Bamia C, Lagiou P, Rinaldi S, Freisling H, Carayol M, Pischon T, Drogan D, Weiderpass E, Jakszyn P, Overvad K, Dahm CC, Tjnneland A, Bouton-Ruault M-C, Khn T, Peppia E, Valanou E, La Vecchia C, Palli D, Panico S, Sacerdote C, Agnoli C, Tumino R, May A, van Vulpen J, Benjaminsen Borch K, Oluwafemi Oyeyemi S, Quirs JR, Bonet C, Sánchez M-J, Dorronsoro M, Navarro C, Barricarte A, van Guelpen B, Wennberg P, Key TJ, Khaw K-T, Wareham N, Assi N, Ward HA, Aune D, Riboli E, Boeing H.** Physical activity, mediating factors and risk of colon cancer: insights into adiposity and circulating biomarkers from the EPIC cohort. *International Journal of Epidemiology* 2017, 46(6), 1823-1835.
- Alvarez-Díaz S, Valle N, Ferrer-Mayorga G, Lombarda L, Herrera M, Domínguez O, Segura MF, Bonilla F, Hernando E, Muñoz A.** MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Human Molecular Genetics* 2012, 21, 2157–2165.
- Andersen SW, Shu XO, Cai Q, Khankari NK, Steinwandel MD, Jurutka PW, Blot WJ, Zheng W.** Total and free circulating vitamin D and vitamin D binding protein in relation to colorectal cancer risk in a prospective study of African Americans.» *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* (American Association for Cancer Research) 2017, 26 (8), 1242-1247 doi:10.1158/1055-9965.EPI-17-0133.
- Arı M, gt S, Dğer FK.** Kanserin nlenmesinde Antioksidanların Rol. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi* 2017, 1 (2), 67-74.
- Arpacı N.** TGFβ VE D Vitamininin Tahmininin MCF-7 Hcresinin Plazminojen Aktivatr Sistemi zerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2015, 98.

Bardon S, Le MT, Alessandri JM. Metabolic conversion and growth effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in the T47D breast cancer cell line. *Cancer Letters* 1996, 99 (1), 51-58.

Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009, 94 (1), 26-34.

Cavalcante IGM, Silva AS, Costa MJC, Persuhn DC, Issa CTMII, Freire TLL, Gonçalves MCR. Effect of vitamin D₃ supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D₃ megadose reduces inflammatory markers. *Experimental Gerontology* 2015, 66, 10-16.

Chamberland JP, Moon HS. Down-regulation of malignant potential by alpha linolenic acid in human and mouse colon cancer cells. *Familial Cancer* 2015, 14 (1), 25-30.

Chen A, Davis BH, Sitrin MD, Brasitus TA, Bissonnette M. Transforming Growth Factor-Beta 1 Signaling Contributes to Caco-2 Cell Growth Inhibition Induced by 1,25(OH)₂D₃. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2002, 283, 864-874.

Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. Flaxseed alone or in combination with tamoxifen inhibits MCF-7 breast tumor growth in ovariectomized athymic mice with high circulating levels of estrogen. *Experimental Biology and Medicine* 2007, 232 (8), 1071-1080.

Chi A, Wildfire J, McLoughlin R, Wood RA, Bloomberg GR, Kattan M, Gergen P, Gold DR, Witter F, Chen T, Holick M, Visness C, Gern J, O'Connor GT. Umbilical cord plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and immune function at birth: the Urban Environment and Childhood Asthma study. *Clinical & Experimental Allergy* 2011, 41, 842-850.

Chirino-Galindo G, Barrera-Argüelles J, Trejo-González N, Mejía-Zepeda R, Palomar-Morales M. Biphase effect of alpha-linolenic acid on glucose-induced dysmorphogenesis and iperoxidation in whole rat embryo in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017, 484 (4), 878-883.

Davies PD, Brown RC, Woodhead JS. Serum concentrations of vitamin D metabolites in untreated tuberculosis. *Thorax* 1985, 40 (3), 187-190.

Dawson-Hughes B, Dallal GE, Kral EA, Haris S, Sokoll LJ, Falconer G. Effect of vitamin D supplementation on wintertime and overall bone loss in healthy postmenopausal women. *Annals of Internal Medicine* 1991, 115 (7), 505-512.

Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews. Cancer* 2007, 7 (9), 684–700.

Değişli CM. Kemik metastazı olan meme kanserli hastalarda verilen D vitamini tedavisinin dolaşımdaki hsp-90 ve ck-18 düzeyleri üzerine etkisi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2010, 94.

DeLuca HF, Zierold C. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutrition reviews* 1998, 56, 4-10.

DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004, 80 (6), 1689-1696.

Deng X, Cheng J, Shen M. Vitamin D improves diabetic nephropathy in rats by inhibiting renin and relieving oxidative stress. *Journal of Endocrinological Investigation* 2016, 39 (6), 657-666.

Di Rosa M, Michele Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D₃: a helpful immuno-modulator. *Immunology* 2011, 134 (2), 123-139.

Dincer Y, Telci A, Kayali R, Yilmaz IA, Cakatay U, Akçay T.Effect of alpha-Lipoic Acid on Lipid Peroxidation and AntiOxidant Enzyme Activities In Diabetic Rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002, 9, 281-284.

Djuric Z, Aslam MN, Simon BR, Sen A, Jiang, Ren j, Chan R, Soni T, Rajendiran TM, SmithWL, Brenner DE. Effects of fish oil supplementation on prostaglandins in normal and tumor colon tissue: modulation by the lipogenic phenotype of colon tumors. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2017, 46, 90–99.

Doroshov JH, Akman S, Esworthy S, Chu FF, Burke T. Doxorubicin resistance conferred by selective enhancement of intracellular glutathione peroxidase or superoxide dismutase content in human MCF-7 breast cancer cells. *Free Radical Research Communications* 1991, 13 (1), 779-781.

Doyle A, Griffiths JB. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. Griffiths JB, Doyle A (eds), John Wiley and Sons, West Sussex, UK, 1998, 62-64.

- Eelen G, Valle N, Sato Y, Rochel N, Verlinden L, De Clercq P, Moras D, Bouillon R, Muñoz A, Verstuyf A.** Superagonistic Fluorinated Vitamin D₃ Analogs Stabilize Helix 12 of the Vitamin D Receptor. *Chemistry&Biology* 2008, 15(10),1029-1034.
- Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ.** The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature Reviews Cancer* 2014, 5, 342-357.
- Feskanich D, Ma J, Fuchs CS, Kirkner GJ, Hankinson SE, Hollis BW, Giovannucci EL.** Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2004, 13 (9), 1502-1508.
- Fischer D, Schroer A, Lüdders D, Cordes T, Bücken B, Reichrath J, Friedrich M.** Metabolism of vitamin D₃ in the placental tissue of normal and preeclampsia complicated pregnancies and premature births. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology* 2007, 34 (2), 80-84.
- Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y.** Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem Journal* 2012, 441(1), 61-76.
- Fleet JC.** Molecular actions of vitamin D contributing to cancer prevention. *Molecular Aspects of Medicine* 2008, 29, 388–396.
- Garrel C, Alessandri JM, Guesnet P, Al-Gubory KH.** Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2012, 44(1), 123–131.
- Genç A, Sevim DG, Özen AT, Yılmaz G.** D Vitaminiinin Çeşitli Hastalıklardaki Nadir Kullanım Alanları. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Dahili Tıp Bilimleri* 2015, 68 (2), 55-63.
- Godman CA, Joshi R, Tierney BR, Greenspan E, Rasmussen TP, Wang HW, Shin DG, Rosenberg DW, Giardina C.** HDAC3 impacts multiple oncogenic pathways in colon cancer cells with effects on Wnt and vitamin D signaling. *Cancer Biology & Therapy* 2008, 7(10), 1570-1580.
- Goldblatt H , Soames KM.** A study of rats on a normal diet irradiated daily by the mercury vapour quartz lamp or kept in darkness. *The Biomedical Journal* 1923, 17 (2), 294-297.
- Grammatikos SI, Subbaiah PV, Victor TA, Miller WM.** Diverse effects of essential (n-6 and n-3) fatty acids on cultured cells. *Cytotechnology* 1994, 15 (1-3), 31-50.

Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative Medicine Review* 2005, 10 (2), 94-111.

Gülçen B, Karaca Ö, Kuş MA, Kaman D, Ögetürk M, Kuş İ. Omega-3 Yağ Asitlerinin Böbrek Antioksidan Savunma Sistemi Üzerindeki Etkisi: Deneysel Bir Çalışma. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 2012, 1 (2), 70-74.

Hamann KL, Lane NE. Parathyroid hormone update.» *Rheumatic Disease Clinics of North America* 2006, 32 (4), 703-719.

Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory Epithelial Cells Convert Inactive Vitamin D to Its Active Form: Potential effects on host defense. *The Journal of Immunology* 2008, 181, 7090-7099.

Hess AF, Lundagen MA. A Seasonal Tide of Blood Phosphate In Infants. *Journal of the American Medical Association* 1922, 79 (27), 2210-2212.

Hochberg Z. Requirements for vitamin D in an indoors culture. *Highlights* 2004, 12: 19-23.

Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2008, 87 (4), 1080-1086.

Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of Clinical Investigation* 2006, 116 (8), 2062-2072.

Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004, 80 (6), 1678-1688.

Holick MF. The Vitamin D epidemic and its health consequences. *The Journal of Nutrition* 2005a, 135 (11), 2739-2748.

Holick MF. Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. *Southern Medical Journal* 2005b, 98 (10), 1024-1027.

Holick MF. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine* 2007, 357, 266-281.

Horia E, Watkins BA. Comparison of stearidonic acid and α -linolenic acid on PGE2 production and COX-2 protein levels in MDA-MB-231 breast cancer cell cultures. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2005, 16 (3), 184-192.

Huerta S, Irwin RW, Heber D, Go VLW, Koeffler HP, Uskokovic MR, Harris DM. $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ and its synthetic analogue decrease tumor load in the Apc(min) Mouse.

Cancer Research 2002, 62, 741–746.

İliçin G, Ünal S, Biberöglu K, Akalın S, Süleymanlar G. İç Hastalıkları 2 (3th ed.), Ünal S, Biberöglu K, Akalın S, Süleymanlar G (eds), Güneş Kitapevi, Ankara, 2012.

Iqbal MN, Khan TA. Chapter 7: Vitamin D, its receptor gene polymorphism and breast cancer. In: A Critical Evaluation of Vitamin D - Clinical Overview, Gowder T, Joghi S (eds), Intech, Rijeka, 2017. DOI:10.5772/64505.

Isenring E, Cross G, Daniels L, Kellett E, Koczwara B. Validity of the malnutrition screening tool as an effective predictor of nutritional risk in oncology outpatients receiving chemotherapy. *Supportive Care in Cancer* 2006, 14, 1152-1156.

Jameson JL, Weetman AP. Tiroid bezi hastalıkları. In: Harrison İç Hastalıkları Prensipleri, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL . Braunwald E (eds)/ Çeviren: Sağlık Y (Edt), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 2004, 2060-2075.

Jensen CB, Thorne-Lyman AL, Hansen LV, Strøm M, Nielsen NO, Cohen A, Olsen SF. Development and Validation of a Vitamin D Status Prediction Model in Danish Pregnant Women: A Study of the Danish National Birth Cohort. *Plos One* 2013, 8 (1), 53-59.

Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 1995, 151, 113-119.

Karaca E, Aytaç S. Yağ Bitkilerinde Yağ Asitleri Kompozisyonu Üzerine Etki Eden Faktörler. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 2007, 22 (1), 123-131.

Kıdır M. D vitamininin immün sistem, deri ve kanser ile ilişkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2013, 20, 158-161.

Kimball S, Fuleihan GH, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2008, 45 (4), 339-414.

Koo WWK, Tsang RC. Calcium and Magnesium Homeostasis. In: Avery's Neonatology Pathophysiology Management of the Newborn, Seshia MMK, Mullet MD, MacDonald MH (eds), Philadelphia, Lippincott, W&W, 2005, 847-875.

Kouchi Z, Fujiwara Y, Yamaguchi H, Nakamura Y, Fukami K. Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type II beta is required for vitamin D receptor-dependent E-cadherin expression in SW480 cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011, 408, 523–529.

Kovalenko PL, Zhang Z, Cui M, Clinton SK, Fleet JC. 1,25 dihydroxyvitamin D-mediated orchestration of anticancer, transcript-level effects in the immortalized, non-transformed prostate epithelial cell line, RWPE1. *BMC.Genomics* 2010, 11-26.

Kuittinen T, Rovio P, Staff S, Luukkaala T, Kallioniemi A, Grénman S, Laurila M, Mäenpää J. Paclitaxel, carboplatin and 1,25-D3 inhibit proliferation of endometrial cancer cells *in vitro*. *Anticancer Research* 2017, 37 (12), 6575-6581.

Kuş G. Hepatosellüler karsinom hücrelerinde karmofurun sitotoksik ve apoptotik etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2017, 18, 55-60.

Kuş İ, Zararsız İ, Ögetürk M, Yılmaz HR, Sarsılmaz M. Deneysel formaldehit toksisitesinde testis SOD, GSH-Px, MDA düzeyleri ve ω -3 yağ asitlerinin koruyucu etkisi. *Firat Tıp Dergisi* 2008, 13 (1), 1-4.

Lambert JR, Kelly JA, Shim M, Huffer WE, Nordeen SK, Baek SJ, Eling TE, Lucia MS. Prostate derived factor in human prostate cancer cells: gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. *J Cell Physiol.* 2006, 208, 566–574.

Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Chicote I, Martín-Fernández G, Puig I, Muñoz A, Pálmer HG. Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/ β -catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PLoS One* 2011, 6(8), e23524.

LeMay-Nedjelski L, Mason-Ennis JK, Taibi A, Comelli EM, Thompson LU. Omega-3 polyunsaturated fatty acids time-dependently reduce cell viability and oncogenic microRNA-21 expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells (MCF-7). *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19, 244. doi:10.3390/ijms19010244.

Leysens C, Marien E, Verlinden L, Derua R, Waelkens E, Swinnen JV, Verstuyf A. Remodeling of phospholipid composition in colon cancer cells by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and its analogs. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2015, 148, 172-178.

Lin R, Nagai Y, Sladek R, Bastien Y, Ho J, Petrecca K, Sotiropoulou G, Diamandis EP, Hudson TJ, White JH. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic

effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol Endocrinol.* 2002, 16, 1243–1256.

Liu PT. The Role of Vitamin D in Innate Immunity: Antimicrobial Activity, Oxidative Stress and Barrier Function 2. In: Vitamin D, Pike JW, Adams JS, Feldman D(eds), USA, Elsevier, 2011, 1811-1823.

Lucas RM, Repacholi, MH, McMichael AJ. Is the current public health message on UV exposure correct? *Bulletin of the World Health Organization* 2006, 84, 485-491.

Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 273 (21), 13245-13254.

Manson JE, Bassuk SS, Lee IM, Cook NR, Albert MA, Gordon D, Zaharris E, MacFadyen JG, Danielson E, Lin J, Zhang SM, Buring JE. The VITamin D and Omega-3 Trial (VITAL): Rationale and design of a large randomized controlled trial of vitamin D and marine omega-3 fatty acid supplements for the primary prevention of cancer and cardiovascular disease. *Contemporary Clinical Trials* 2012, 33, 159 - 171.

Mason-Ennis JK, Klaire S, Kharotia S, Wiggins AKA, Thompson LU. α -linolenic acid and docosahexaenoic acid, alone and combined with trastuzumab, reduce HER2-overexpressing breast cancer cell growth but differentially regulate HER2 signaling pathways. *Lipids in Health and Disease* 2015, 14 (1), 91.

Mason-Ennis JK, LeMay-Nedjelski LP, Wiggins AKA, Thompson LU. Exploration of mechanisms of α -linolenic acid in reducing the growth of oestrogen receptor positive breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Functional Foods* 2016, 24, 513-518.

Minotti G. Sources and role of iron in lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* 1993, 6 (2), 134-146.

Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Drug And Therapeutics Committee Of The Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008, 122 (2), 398-417.

Mokhtari Z, Hekmatdoost A, Nourian M. Antioxidant efficacy of vitamin D. *Journal of Parathyroid Disease* 2017, 5(1), 11–16.

Murray A, Madden SF, Synnott NC, Klinger R, O'Connor D, O'Donovan N, Gallagher W, Crown J, Duffy MJ. Vitamin D receptor as a target for breast cancer therapy. *Endocrine-Related Cancer* 2017, 24 (4), 181–195.

Narvaez CJ, Welsh J. Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276 (12), 9101–9107.

Nizamhoğlu M. Lipidler “Biyokimya” (1st ed), Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınevi Ünitesi, 1998.

O'Kelly J, Koeffler HP. Vitamin D analogs and breast cancer. In: Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy, Tilgen W, Friedrich M, Reichrath J(eds), Recent Results in Cancer Research (RECENTCANCER), Springer, Berlin, Heidelberg, 2003, 333-348.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979,95 (2), 351-358.

Ossola JO, Groppa MD, Tomaro ML. Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulfate. *Arch Biochem Biophys.* 1997, 337, 332-337.

Özkan B, Döneray H. D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2011, 54: 99-119.

Palmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, García de Herreros A, Lafarga M, Muñoz A. Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *Journal of Cell Biology* 2001, 154(2), 369-387.

Palmer HG, Larriba MJ, Garcia JM, Ordonez-Moran P, Pena C, Peiro S, Puig I, Rodriguez R, de la Fuente R, Bernad A, Pollan M, Bonilla F, Camallo C, Garcia de Herreros A, Munoz A. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nature Medicine* 2004, 10, 917–919.

Peehl DM, Shinghal R, Nonn L, Seto E, Krishnan AV, Brooks JD, Feldman D. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol.Biol.* 2004, 92, 131-141.

Pendás-Franco N, Aguilera O, Pereira F, González-Sancho JM, Muñoz A. Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. *Anticancer Research* 2008, 28(5A), 2613-2623.

Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *The Journal of Endocrinology* 2005, 187 (3), 311-325.

Ravid A, Rucker D, Machlenkin A, Rotem C, Hochman A, Kessler-Icekson G, Liberman UA, Koren R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Research* 1999, 59 (4), 862–867.

Rochat MK, Ege MJ, Plabst D, Steinle J, Bitter S, Braun-Fahrländer C, Dalphin JC, Riedler J, Roponen M, Hirvonen M, Büchele G, Renz H, Lauener R, Krauss-Etschmann S, Mutius EV and et.al. Maternal vitamin D intake during pregnancy increases gene expression of ILT3 and ILT4 in cord blood. *Clinical & Experimental Allergy* 2010, 40, 786-794.

Roy S, Rawat AK, Sammi SR, Devi U, Singh M, Gautam S, Yadav RK, Rawat JK, Singh L, Ansari MN, Saeedan AS, Pandey R, Kumar D, Kaithwas G. Alpha-linolenic acid stabilizes HIF-1 α and downregulates FASN to promote mitochondrial apoptosis for mammary gland chemoprevention. *Oncotarget* 2017, 8 (41), 70049-70071.

Rubin MR, Cosman F, Lindsay R, Bilezikian JP. The Anabolic Effects of Parathyroid Hormone. *Osteoporosis International* 2002, 13 (4), 267-277.

Sadi G, Sadi S. Diyabetik Sıçan Karaciğer Dokularında Oksidatif Hasar Parametrelerinin ve Antioksidan Enzimlerin Değişimleri. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 2011, 4(3), 14-19.

Saggar JK, Chen J, Corey P, Thompson LU. The effect of secoisolariciresinol diglucoside and flaxseed oil, alone and in combination, on MCF-7 tumor growth and signaling pathways. *Nutrition and Cancer* 2010, 62 (4), 533-542.

Senatorov IS, Moniri NH. The role of free-fatty acid receptor-4 (FFA4) in human cancers and cancer cell lines. *Biochemical Pharmacology* 2018, 150, 170–180.

Sen S, Döğler FK, Sen S, Aydın ON, Karul A, Dost T. The protective effect of nitroglycerin on gastrointestinal and renal side effects of lornoxicam in rats. *European Journal of Pharmacology* 2006, 541, 191–197.

Serini S, Cassano R, Corsetto PA, Rizzo AM, Calviello G, Trombino S. Omega-3 PUFA Loaded in Resveratrol-Based Solid Lipid Nanoparticles: Physicochemical properties and antineoplastic activities in human colorectal cancer cells *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19 (2), 586. doi:10.3390/ijms19020586.

- Seven A, Güzel S, Seymen O, Civelek S, Bolayırılı M, Uncu M, Burçak G.** Effects of Vitamin E supplementation on oxidative stress in STZ induced diabetic rats: Investigation of Liver and Plasma. *Yonsei Med Journal*. 2004, 45(4), 703-710.
- Shabahang M, Buras RR, Davoodi F, Schumaker LM, Nauta RJ, Evans SRT.** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Receptor as a Marker of Human Colon Carcinoma Cell Line Differentiation and Growth Inhibition. *Cancer Research* 1993, 53, 3712-3718.
- Shah S, Islam MN, Dakshanamurthy S, Rizvi I, Rao M, Herrell R, Zinser G, Valrance M, Aranda A, Moras D, Norman A, Welsh J, Byers SW.** The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Molecular Cell* 2006, 21, 799–809.
- Silva JAP, Fabre MES, Waitzberg DL.** Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and/or radiotherapy: A systematic review. *Clinical Nutrition* 2015, 34, 359-366.
- Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, Tenniswood M, Welsh J.** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1996, 58 (4), 367–376.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985, 150 (1), 76-85.
- Spina C.** Colon cancer and solar ultraviolet B radiation and prevention and treatment of colon cancer in mice with vitamin D and its Gemini analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97(1-2);111-120.
- Squadrito GL, Pryor WA.** Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biology & Medicine* 1998, 25 (4-5), 392-403.
- Stone NJ.** Fish consumption, fish oil, lipids, and coronary heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1997, 65 (4), 1083–1086.
- Sun J.** The role of vitamin D and vitamin D receptors in colon cancer. *Clinical and Translational Gastroenterology* 2017, 8 (6), e103. doi:10.1038/ctg.2017.31.
- Tezcan Fİ.** D Vitamini ve İmmün Sistem. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Dergisi* 2012, 8 (2), 66-68.
- Toplan S, Darıyerli N, Özçelik D, Akyolcu MC.** Sıçanlarda deneysel bakır uygulamasının oksidan ve antiosidan sistemler üzerine etkileri. *Cerrahpaşa J Med*. 2003, 34, 185-187.

- Touvier M, Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Riboli E, Hercberg S, Norat T.** Meta-analyses of vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status, vitamin D receptor polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 2011, 20, 1003–1016.
- Trump DL, Deeb KK, Johnson CS.** Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer Journal* 2010, 16(1), 1–9.
- Van den Bemd GJ, Chang GT.** Vitamin D and Vitamin D Analogs in Cancer Treatment. *Current Drug Targets* 2002, 3 (1), 85-94.
- Vaughan-Shaw PG, O'Sullivan F, Farrington SM, Theodoratou E, Campbell H, Dunlop MG, Zgaga L.** The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer* 2017, 116 (8), 1092-1110.
- Vieth R.** What is the optimal vitamin D status for health? *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2006, (92) 26-32.
- Ward LM.** Vitamin D deficiency in the 21st century: a persistent problem among Canadian infants and mothers. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* 2005, 172 (6), 769–770.
- Weisman Y.** Non-classic unexpected functions of vitamin D. *Pediatric Endocrinology Reviews* 2010, 8 (2), 103-107.
- White JH.** Vitamin D and Innate Immunity (3rd ed), Feldman DPJ, Adams JS (eds), Elsevier, United States, 2011, 1777-1787.
- Wiggins AKA, Mason JK, Thompson LU.** Growth and gene expression differ over time in alpha-linolenic acid treated breast cancer cells. *Experimental Cell Research* 2015, 333, 147-154.
- World Health Organization (WHO).** (2017). Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (25.04.2018).
- Wu K, Feskanich D, Fuchs CS, Willett WC, Hollis BW, Giovannucci EL.** A nested case control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2007, 99 (14), 1120-1129.
- Yang L , Ma J , Zhang X , Fan Y , Wang L.** Protective role of the vitamin D receptor. *Cellular Immunology* 2012, 279 (2), 160-166.

Yıldırım O, Büyükbingöl Z. Effects of supplementation with a combination of cobalt and ascorbic acid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in streptozocin diabetic rat liver. *Biological Trace Element Research* 2002, 90, 143- 154

Yılmaz İ. Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres . *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2010, 17 (2), 143-153.

Zararsız İ, Kuş İ, Akpolat N, Songur A, Ögetürk M, Sarsılmaz M. Protective effects of w-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. *Cell Biochemistry and Function* 2006, 24, 237-244.

Zgaga L, Theodoratou E, Farrington SM, Din FV, Ooi LY, Glodzik D, Johnston S, Tenesa A, Campbell H, Dunlop MG. Plasma vitamin D concentration influences survival outcome after a diagnosis of colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2014, 32 (23), 2430–2439.

Zhang SS, Noordin MM, Rahman SO, Haron J. Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and defence in rats. *Vet Hum Toxicol.* 2000, 42,261-264.

Zhu J, DeLuca HF. Vitamin D 25-hydroxylase — Four decades of searching, are we there yet? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2012, 523, 30–36.

EKLER

Ek 1. D vitamini konsantrasyonları için WST-1 Testi Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Saat	221,902	2	110,951	1,175	0,326
Konsantrasyon	5132,134	3	1710,711	18,112	0,000
Saat * Konsantrasyon	1322,700	6	220,450	2,334	0,064
Hata	2266,873	24	94,453		

Ek 2. α -Linolenik asit konsantrasyonları için WST-1 Testi Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Saat	2740,894	2	1370,447	122,444	0,000
Konsantrasyon	24374,070	5	4874,814	435,547	0,000
Saat * Konsantrasyon	2202,304	10	220,230	19,677	0,000
Hata	402,927	36	11,192		

Ek 3. α -Linolenik asit + D vitamini konsantrasyonları için WST-1 Testi Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Saat	1339,840	2	669,920	8,793	0,000
Konsantrasyon	157250,922	15	10483,395	137,600	0,000
Saat * Konsantrasyon	14248,288	30	474,943	6,234	0,000
Hata	7314,007	96	76,188		

Ek 4. D vitamini konsantrasyonları için BCA Toplam Protein Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
KONSANTRASYON	845272,000	3	281757,333	390,787	0,000
Hata	2884,000	4	721,000		

Ek 5. α -Linolenik asit konsantrasyonları için BCA Toplam Protein Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
KONSANTRASYON	777969,417	5	155593,883	48,634	0,000
Hata	19195,500	6	3199,250		

Ek 6. α -Linolenik asit + D vitamini konsantrasyonları için BCA Toplam Protein Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
KONSANTRASYON	2700229,875	15	180015,325	23,772	0,000
Hata	121162,000	16	7572,625		

Ek 7. D vitamini konsantrasyonları için MDA Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	0,191	3	0,064	318	0,000
Hata	0,001	4	0,000		

Ek 8. α -Linolenik asit konsantrasyonları için MDA Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	15,508	5	3,102	15508,267	0,000
Hata	0,001	6	0,000		

Ek 9. α -Linolenik asit + D vitamini konsantrasyonları için MDA Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	39,547	15	2,636	13182,2	0,000
Hata	0,003	16	0,000		

Ek 10. D vitamini konsantrasyonları için NO Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	65,400	3	21,800	10,900	0,021
Hata	8,00	4	2,000		

Ek 11. α -Linolenik asit konsantrasyonları için NO Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	6686,550	5	1337,310	668,655	0,000
Hata	12,000	6	2,000		

Ek 12. α -Linolenik asit + D vitamini konsantrasyonları için NO Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	22955,189	15	1530,346	765,173	0,000
Hata	32,000	16	2,000		

Ek 13. D vitamini konsantrasyonları için GPx Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	58,095	3	19,365	9,683	0,026
Hata	8,000	4	2,000		

Ek 14. α -Linolenik asit konsantrasyonları için GPx Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	167103,390	5	33420,678	16710,339	0,000
Hata	12,000	6	2,000		

Ek 15. α -Linolenik asit + D vitamini konsantrasyonları için GPx Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	171100,715	15	11406,714	5703,357	0,000
Hata	32,000	16	2,000		

Ek 16. D vitamini konsantrasyonları için SOD Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	5,500	3	1,833	0,917	0,509
Hata	8,000	4	2,000		

Ek 17. α -Linolenik asit konsantrasyonları için SOD Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	16053,667	5	3210,733	1605,367	0,000
Hata	12,000	6	2,000		

Ek 18. α -Linolenik asit + D vitamini konsantrasyonları için SOD Tayini Varyans Analizi

Varyasyon Katsayıları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Derecesi
Konsantrasyon	30239,500	15	2015,967	1007,983	0,000
Hata	32,000	16	2,000		

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : GÜNAY, Nurhan
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Ankara/07.03.1978
Telefon : 0505 3193991
E-mail : Nurhan.gunay@adu.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü	2000

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

-

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
09/2012-devam ediyor	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Köşk MYO Gıda Kalite Kontrolü ve Analizi Programı	Öğretim Görevlisi
04/2008-09/2012	AYTB Aydın Ticaret Borsası Laboratuvar Hizmetleri A.Ş.	Su, Atıksu Analiz Laboratuvarı Sorumlusu
08/2007-03/2008	Helvacı LPG İstasyonu	Sorumlu Müdür
05/2005-05/2007	Aydın İli Çevre Koruma Vakfı Atıksu Laboratuvarı	Laboratuvar Sorumlusu
2004-2005	İSMAİL HAKKI Lokumları, Tuğba Kuruyemiş, Setenoğlu İncir İşletmesi	Sorumlu Müdür
02-12/2003	MAROLİ Gıda A.Ş.	Üretim Mühendisi

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

-

2. PROJELER

Kafkas *Apis mellifera caucasica* ve Anadolu arısı Ege ekotipi *Apis mellifera ataloliaca* Ana Arıların Yeni Kolonilere Kabulünde Bazı feromonların etkisi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer: GÜNAY NURHAN, Yürütücü:UÇAK KOÇ A., 01/05/2015 - 25/08/2017 (ULUSAL)

Farklı Dönemlerde yetiştirilen Kafkas *Apis mellifera caucasica* İtalyan *Apis mellifera ligustica* ve Anadolu Arısı Ege Ekotipi *Apis mellifera ataloliaca* Ana Arıların Bazı Feromon Miktarlarının Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: GÜNAY N., Yürütücü:UÇAK KOÇ A., 22/04/2015-25/03/2017 (ULUSAL).

Farklı Dönemlerde yetiştirilen Kafkas *Apis mellifera caucasica* İtalyan *Apis mellifera ligustica* ve Anadolu Arısı Ege Ekotipi *Apis mellifera ataloliaca* Ana Arıların Bazı Feromon Miktarlarının Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: GÜNAY N., Yürütücü:UÇAK KOÇ A., 22/04/2015-25/03/2017 (ULUSAL)

Köşk Meslek Yüksekokulu Uygulama Laboratuvarı Kurulum Projesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: GÜNAY N., 24/03/2014 - 05/01/2015 (ULUSAL)

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Akgül, H. N., Can, A., Yıldız-Akgül, F., Günay, N., Karaman, A.D. 2018. Intangible Cultural Heritage: Keskek (Germencik Sample). The 4th International Symposium On “Traditional Foods From Adriatic To Caucasus” 19-21 April 2018 Kyrenia / Northern Cyprus. Other Traditional Foods Abstract Reference: 523.

Çat, Ö., Yıldız-Akgül, F., Kale, G., Akgül, H.N., Günay, N. 2018. İncirliova Milk-Jam Production And Its Modernization. The 4th International Symposium On “Traditional Foods From Adriatic To Caucasus” 19-21 April 2018 Kyrenia / Northern Cyprus. Other Traditional Foods Abstract Reference : 506.

Günay, N., Bölük, İ., Akgül H.N., Karaman A.D., 2017. Öğrencilerin Sağlıklı Beslenme Bilinç Düzeyi ve Tercihlerinin Belirlenmesi:KÖŞK MYO Örneği. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 29 Haziran-2 Temmuz 2017, Aydın. Sözlü Bildiri.

Günay, N., Bölük, İ., Akgül H.N., Karaman A.D., 2017. Üniversite Öğrencilerinde Beslenme Alışkanlıklarının Belirlenmesi, Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 29 Haziran-2 Temmuz 2017, Aydın. Poster.

Günay N., Bölük İ. (2013). Caper Jam. The 2'nd International Symposium On "Traditional Foods From Adriatic To Caucasus" (Yayın No:707465)

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Denizli M., Aydın S., Kaplanlı N., Günay N. (2014). Zeytindeki Fenolik Maddeler Ve Sağlık Üzerine Etkileri. IV. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi. (Yayın No: 1080922)

Günay Nurhan, Keser Burcu, Tekgül Yeliz (2014). İklim Koşullarının Zeytinyağının Sterol Kompozisyonuna Etkisi. IV. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi (Yayın No:1080927)