

**LİKOPENİN ER(+) HeLa VE LNCaP
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE
ANTİKARSİNOJENİK AKTİVİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sinem ILGIN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Ekim-2004

JURİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sinem ILGIN'ın "LİKOPENİN ER(+) HeLaVE LNCaP KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE ANTİKARSİNOJENİK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 01.10.2004 tarihinde, aşağıdaki juri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yrd. Doç. Dr. Bülent ERGUN	
Üye	: Prof.Dr. Asuman KARAKAYA	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Seval KORKMAZ	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17.09.2004 tarih ve30..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Enstitü Müdürü



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİKOPENİN ER(+) HeLa VE LNCaP KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE ANTİKARSİNOJENİK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sinem ILGIN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Bülent ERGUN

2004

Likopen domates başta olmak üzere kırmızı sebze ve meyvelerde bulunan kemopreventif ve antikarsinojenik etkili karotenoid yapılı biyoaktif bir bileşendir. Antikarsinojenik etkisi çeşitli hücre kültürü, hayvan modelleri ve epidemiyolojik çalışmalarla gösterilen likopenin bu etkisinde çeşitli mekanizmaların rol aldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada likopen ve standart madde olarak kullanılan β -karotenin, NIH3T3 fibroblast, LNCaP prostat kanseri ve HeLa serviks adenokarsinoma hücreleri üzerindeki antikarsinojenik aktiviteleri ve bu aktivitenin etki mekanizmasında östrojenik reseptörlerin rolü incelenmiştir. Sitotoksik aktiviteyi saptamak için BrdU, MTT ve TNF test yöntemleri uygulanmıştır. Sonuç olarak likopenin LNCaP prostat kanseri hücrelerinde antikarsinojenik etkili olduğu, bu etkide likopenin östrojenik aktivitesinin önemli rol oynadığı ve HeLa serviks adenokarsinoma hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: likopen, antikarsinojenik aktivite, prostat kanseri, serviks kanseri, hücre kültürü

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CONSIDERATION OF ANTICARCINOGENIC ACTIVITY OF LYCOPENE ON ER(+) HeLa AND LNCaP CANCER CELLS

Sinem ILGIN

**Anadolu University Graduate School of Health Sciences Department of
Pharmaceutical Toxicology**

Supervisor: Assist. Prof. Bülent ERGUN

2004

Lycopene is an anticarcinogenic and chemopreventive carotenoid bioactive compound which is present primarily in tomatoes and the other red vegetables. The beneficial health effects of lycopene have been indicated with several cell culture studies, animal models and epidemiological studies. It has been reported that several mechanisms play an important role in the anticarcinogenic activity of lycopene. In this study, the anticarcinogenic activities of lycopene and β -carotene which is used as a standard and role of the oestrogenic mechanisms in this activity have been investigated on NIH3T3 fibroblast, LNCaP prostate cancer and HeLa cervix adenocarcinoma cells. BrdU, MTT and TNF test procedures have been applied to determine of cytotoxic activity tests. Results have shown that lycopene has anticarcinogenic activity on LNCaP prostate cancer cells and oestrogenic mechanisms have an important part in this activity. On the other hand, it has been observed that lycopene induces the proliferation of HeLa cervix adenocarcinoma cells.

Keywords: Lycopene, anticarcinogenic activity, prostate cancer, cervix cancer, cell culture

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda bilgileri ile beni yönlendiren, desteğini esirgemeyen sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Bülent ERGUN' a,

Bana inanıp tüm bildiklerini öğreten, yanımda olduğunu hep hisettiğim sevgili hocam Yrd.Doç.Dr. Seval KORKMAZ' a,

Desteği için sevgili hocam Doç.Dr. Göksel ALTIOKKA' ya,

Yardıımı ve sonsuz sabrı için arkadaőım Arő.Gör. Ahmet SARAçOğLU' na,

Her zaman yanımda olan arkadaőım Arő.Gör Nurcan BEKTAŐ' a,

Çalıőmamızı gerekleőtirmemizde laboratuvar imkanlarını kullanmamızı sağlayan ABİBAM yönetimine

Sonsuz teőekkrlr....

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLO ve ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	
2.1. Biyoaktif Bileşikler	3
2.2. Karotenoid Bileşikler	3
2.2.1. Likopen	
2.2.1.1. Likopenin kimyasal yapısı	6
2.2.1.2. Likopen içeren besin kaynakları	7
2.2.1.3. Likopenin absorpsiyonu, metabolizması ve dokulardaki dağılımı	8
2.2.1.4. Likopen etki mekanizması	11
i. Antioksidan etkileri ve serbest radikaller ile etkileşmesi	
ii. İmmün sistem modülasyonu	
2.2.1.5. Likopenin biyokimyasal etkileri	12
i. Oksidatif etkileri	
ii. Nonoksidatif etkileri	
2.2.1.6. Likopenin insan sağlığındaki rolü	13
i. Doku kültürü çalışmaları	14
ii. Hayvan çalışmaları	15
iii. Epidemiyolojik çalışmalar	16

2.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler ve Hücreler Hakkında Genel Bilgi	18
2.3.1. Çalışmada kullanılan yöntemler hakkında genel bilgi	
2.3.1.1. Tümör Nekroz Faktör	18
2.3.1.2. Mitokondriyal aktiviteye dayalı testler ve MTT	20
2.3.1.3. BrdU hücre proliferasyon ölçümü	21
2.3.2. Deneylerde kullanılan hücreler hakkında genel bilgi	
2.3.2.1. NIH3T3 fibroblast hücreleri	22
2.3.2.2. HeLa serviks adenokarsinoma hücreleri	22
2.3.2.3. LNCaP prostat kanser hücreleri	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	
3.1. Materyal	
3.1.1. Kullanılan Hücreler	24
3.1.2. Kimyasal Madde ve Çözeltiler	24
3.1.3. Kültür Ortamı Çözeltileri	24
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	25
3.1.5. Kullanılan Malzemeler	25
3.2. Yöntem	
3.2.1. Likopen Çözeltilisinin Hazırlanması	26
3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	26
3.2.2.1. Besiyeri Hazırlanması	
i) Tam medyum hazırlanması	26
ii) %10 FCS' li DMEM medyum hazırlanması	27
3.2.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması	27
3.2.2.3. HeLa, LNCaP, NIH3T3 Hücre Kültürü	28
3.2.2.4. Sitotoksosite Testleri	
i) Tümör Nekroz Faktör (TNF) Testi	28
ii) MTT Testi	31
iii) Hücre Çoğalması Testi (Cell Proliferation)	32
3.2.3. İstatistiksel Değerlendirmeler	33

4. BULGULAR	
4.1. Likopen Sonuçları	
4.1.1. Likopenin MTT Ölçüm Sonuçları	34
4.1.2. Likopenin BrdU Proliferation Testi Ölçüm Sonuçları	37
4.1.3. Likopenin TNF Testi Sonuçları	40
4.2. β-karoten Sonuçları	
4.1.1. β -karotenin MTT Ölçüm Sonuçları	43
4.1.2. β -karotenin BrdU Prolifertion Testi Ölçüm Sonuçları	46
4.1.3. β -karotenin TNF Testi Ölçüm Sonuçları	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1. Likopenin kimyasal yapısı	7
2. Likopenin insan sağlığındaki rolü	17
3. Likopenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	34
4. Likopenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	35
5. Likopenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	36
6. Likopenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	37
7. Likopenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	38
8. Likopenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	39
9. Likopenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ölçümü ile değerlendirilmesi	40
10. Likopenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ölçümü ile değerlendirilmesi	41
11. Likopenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ölçümü ile değerlendirilmesi	42
12. β -karotenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	43
13. β -karotenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	44
14. β -karotenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	45
15. β -karotenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	46
16. β -karotenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	47

17. β -karoetin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmesi	48
18. β -karotenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ölçümü ile değerlendirilmesi	49
19. β -karotenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ölçümü ile değerlendirilmesi	50
20. β -karotenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ölçümü ile değerlendirilmesi	51

TABLO ve ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1. Biyoaktif bileşiklerin besin kaynakları	4
2. Sebze ve meyvelerdeki likopen miktarları	7
3. Domates ve domates kaynaklı besinlerin içerdği likopen miktarı	8
4. Doku likopen seviyeleri	10
5. Hücre kültürü çalışmalarında likopenin farklı hücreler üzerinde gösterdiği etkiler	14
6. Hayvan model sistemleri kullanılarak yapılan çalışmalar	15
7. Likopen ve kronik hastalıklar arasındaki ilişkiyi gösteren epidemiyolojik çalışmalar	16
8. İnsanlarda TNF- α 'nın majör hücresel kaynakları	18
9. TNF- α 'nın üretimini indükleyen majör fizyolojik etkenler	19

1. GİRİŞ

Kanser ve kardiyovasküler hastalıklar, günümüzde ölümle sonuçlanan hastalıkların başında gelmektedir. Bu hastalıkların gelişiminde genetik faktörler ve yaş kadar, beslenmenin de önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir [1, 2, 3]. Kanser konusundaki yeni yaklaşımlara göre hastalık oluştuktan sonra tedavi etmek yerine kanser oluşumunun engellenmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle özellikle kemopreventifler, nutrasötikler ve antioksidanlar gibi kimyasal gruplar giderek değer kazanmaya başlamıştır. Bu gruplar genellikle besinlerin içerdiği doğal bileşenlerdir. Kanser ve diğer hastalıklar üzerine bu maddelerin etkilerinin desteklenmesi amacıyla son yıllarda yapılmış olan pek çok çalışma olmasına rağmen bu grupların içerdiği kimyasal maddelerin çokluğu sebebi ile üzerinde halen araştırma yapılması gereken daha pek çok madde bulunmaktadır.

Hücrelerin yaşlanma sebeplerinin başında oksidatif stres gelmektedir. Oksidatif stres aynı zamanda kanserleşmede de rol oynayan bir faktör olduğu için antioksidan bileşikler ve özellikle doğal antioksidanlar giderek değer kazanmaktadır. Oksidatif stresin ürünleri olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) rolü ve biyomoleküller üzerindeki oksidatif hasarı, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların patojenezisinde önemli rol oynamaktadır. Sebze ve meyvelerin artan tüketimi ile bu hastalıklara yakalanma riskinin azaldığı düşünülmektedir. Fitokimyasal bileşiklerle yapılan pek çok çalışmada bu düşünceyi desteklemektedir [1, 2, 4, 5].

Günümüzde gittikçe değer kazanan nutrasötikler içerdikleri antioksidan maddelerin etkilerinden dolayı ya preparat haline getirilerek ya da standardize edilerek bitki standart ekstresi halinde kullanıma sunulmaktadır.

Antioksidan maddeler içinde önemli bir grubu oluşturan karotenoidler 600 kadar üyesi olan büyük bir pigment grubudur ve bitkilerde oksidatif strese karşı koruyucu olarak sentezlenmektedirler. En önemli karotenoidler arasında α -karoten, β -karoten, likopen ve lutein yer almaktadır. Günlük tüketimde kullanılan meyve ve sebzelerde en fazla bulunan karotenoid yapılı bileşiklerin başında β -karoten ve likopen gelmektedir [1, 2]. Yapılan bir çalışmada, likopenin β -karotenden iki kat ve α -tokoferolden on kat etkili bir serbest radikal süpürücü

bileşik olduğu gösterilmiştir [2]. Bu nedenle, yapılan deneylerde β -karoten standart madde olarak kullanılmıştır.

Likopen domates başta olmak üzere kırmızı sebze ve meyvelerde bulunan biyoaktif bir bileşendir. Kemopreventif etkisi nedeniyle likopenin başta prostat kanseri olmak üzere pek çok kanser türüne ve kalp hastalıklarına yakalanma riskini azaltabileceği çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Karotenoid yapılı bir bileşik olan likopenin bu etkilerinin antioksidan özelliğine ve/veya immunomodülatör aktivitesine bağlı olduğu düşünülmektedir [1]. Kemopreventif etkili olduğu bilinen likopenin bu etkisinde antioksidan mekanizmaların yanı sıra hangi mekanizmaların etkili olduğu henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Bu konuda, daha çok epidemiyolojik çalışmalar yapılmış olup hücre kültürlerinde yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında,

- Kemopreventif aktivitesi bilinen likopenin kontrol grubu olarak kullanılan NIH3T3 fibroblast hücrelerine karşı LNCaP prostat kanseri ve HeLa serviks adenokarsinoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi,
- Prostat kanseri gelişimini önleyici etkisi olduğu ileri sürülen likopenin, prostat kanser hücreleri üzerinde antikarsinojenik aktivitesinin araştırılması,
- Antikarsinojenik aktivite etki mekanizmasında östrojenik reseptörler ile olan ilişkisinin değerlendirilmesi

amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Biyoaktif Bileşikler

ROT' u inaktive eden ve oksidatif hasardan korunmayı sağlayan gıdalardaki antioksidanlar biyoaktif moleküller olarak adlandırılırlar [1]. Bu biyoaktif bileşikler, bitkisel ürünlerde ve lipidce zengin besinlerde küçük miktarlarda doğal olarak meydana gelen ve besin değerini arttıran bileşiklerdir [6]. Bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşikler flavonoidler, fitoöstrojenler, bitki steroller, isoflavonlar, organosülfür bileşikler, likopen ve resveratrol' dür [1, 6]. Bu fitokimyasal bileşenlerin, hormonal metabolizma ve oksidatif hasar üzerine etkilerinin, sahip oldukları kemopreventif aktiviteden kaynaklandığı düşünülmektedir [1]. Epidemiyolojik bulgular da çeşitli kanser türleri ve kardiyovasküler hastalıklarda meyve ve sebze ağırlıklı diyetlerin koruyucu rolü olduğunu göstermiştir [1, 3, 6, 7]. Tablo 1' de bazı biyoaktif bileşiklerin biyolojik etkileri verilmiştir [6].

Tablo 1 [6] kanser ve kardiyovasküler hastalıklar üzerinde bazı biyoaktif bileşiklerin biyolojik etkileri

2.2. Karotenoid Bileşikler

Karotenoidler bitkiler, algler ve bakteriler tarafından sentezlenen kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu özelliği olan pigment gurubudur [8, 9, 11, 12]. Kimyasal yapı olarak karotenoidler, uç uca bağlanarak birleşen iki tetraterpen ünitesinden oluşmaktadırlar. Son grupların siklizasyonu ile karotenoidler bir veya iki halkaya sahiptir. Karbon ve hidrojen atomlarının yanında oksijen atomu da taşıyabilirler [1]. Doğada yaklaşık olarak 600 çeşit karotenoid bulunur [10, 11, 13]. Bunların bazıları saf hidrokarbon (karoten) halindeyken bazıları da oksijenli fonksiyonel gruplar (ksantofiller) halinde bulunur [13]. α -karoten, β -karoten, β -kriptoksantin, lutein ve likopen majör plazma karotenoidleridir [4, 11, 13]. β -karoten, çeşitli meyve (mango, kayısı, kantalu) ve sebzelerde (havuç, kırmızı biber, kabak, taze patates ve yeşil yapraklı sebze) bulunurken α -karoten havuç, kabak, bal kabağında bulunur. β -kriptoksantin mango, kayısı, kantalu, havuç, kırmızı biber, taze patates ve yeşil yapraklı sebzelerde bulunmaktadır [13]. Besinlerden karotenoidlerin

Tablo 2.1. [6] kardiyovasküler hastalık ve kanser için seçilmiş biyoaktif bileşiklerin potansiyel olarak sağlığa yararları

Biyoaktif Bileşik	Örnekler	Kaynaklar	Bilinen Yararlı Biyolojik Etkiler
Flavonoidler Flavonoller	Kuersetin, kamferol, kateşin	Soğan, elma, çay, çilek, zeytin, brokoli, kırmızı şarap, kakao / çikolata, kıvırcık salata	↓ TC, ↓ LDL-C oksidasyon, ↓ tümör başlaması / gelişmesi, ↓ tümör başlaması / gelişimi, AO _x , ↑ HDL- C
Flavonoller	Epikateşin, epigallokateşin, epikateşin-3-gallat, epigallokateşin-3-gallat	Yeşil / siyah çay, kakao / çikolata	↓ tümör başlaması / gelişimi, apoptozis, karsinojen detoksifikasyonu, antimitajen, AO _x , ↓ LDL- C oksidasyonu
Fitoöstrojenler Lignanlar, koumestran	Enterolakton, enterodial, koumestrol	Kabayonca, karanfil	↓ LDL- C, AO _x , östrojen / antiöstrojen
İsoflavonlar	Genistein	Bakla, bezelye	↓ TC ve LDL- C, ↓ LDL- C oksidasyon, ↓ trombozis, ↓ TG, östrojen / antiöstrojen, ↓ anjiyenezis, ↑ HDL- C, AO _x ; olumsuz etki: prokarsinojen potansiyeli
Resveratrol		Üzüm, kırmızı şarap, yerfıstığı	↓ LDL- C oksidasyon, ↓ trombozis, tümör başlaması / gelişimi, östrojen / antiöstrojenkarsinojen detoksifikasyonu, antimitajen, AO _x
Likopen		Domates, domates ürünleri	↓ LDL- C ve LDL- C oksidasyon, AO _x , antimitajen
Organosülfür bileşikleri	Allisin, diallil sülfid, diallil disülfid, allil merkaptan	Sarımsak, soğan, pırasa	↓ TC ve LDL- C, ↓ TG, ↓ kolesterol, ↓ BP, ↓ trombozis, karsinojen detoksifikasyonu, ↓ tümör gelişimi, AO _x ; olumsuz etki: tümör gelişim potansiyeli?

AO_x:Antioksidan aktivite TC:Total kolesterol TG:Trigliserid LDL-C:Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol HDL-C:Yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol
BP:Kan basıncı CVD:Kardiyovasküler hastalıklar

biyoyararlanımının ölçülmesi, plazma karotenoid içeriğinde veya plazma triaçil gliserolce zengin fraksiyonunda oluşan artışın gözlenmesi ile değerlendirilir [8].

Karotenoidler, hidrofobik maddeler olduklarından sudaki çözünürlükleri zayıf, tetrahidrofuran (THF) veya dimetilsülfoksit (DMSO) gibi organik çözücülerdeki çözünürlükleri fazladır [4, 8, 9, 14]. Bu nedenle karotenoidlerin stok solüsyonları THF' da hazırlanırken çalışma solüsyonları etanol ile stok solüsyonun seyreltilmesiyle hazırlanmaktadır [4]. Karotenoidlerin sahip oldukları uzun polien yapısı, onların UV ışığını absorblamasına ve oksidasyona karşı duyarlılığının artmasına neden olmaktadır [13]. Karotenoidler atmosferik oksijen ve ışık ile renksiz bozulma ürünlerine oksitlendiklerinden antioksidan ilavesi şarttır. Bu nedenle karotenoid çözeltilerine, karotenoidlerin oksidatif kayıplarını önlemek için askorbik asit ilave edilir [4]. Karotenoidler -70°C ' den daha yüksek sıcaklıklarda saklandığında ve / veya tekrar edilen eritme, dondurma işlemleri sırasında veya depolama esnasında bozulabilir [15].

Karotenoidler, immünomodülasyon hücrelerarası geçit bölgelerindeki (gap junction) iletimi sağlayan, karsinojen metabolizma enzimlerini indükleyen, fotoproteksiyon ve antioksidan özelliklere sahip maddelerdir [11]. Bilindiği gibi DNA veya membranlardaki oksidatif hasar kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır [5]. Karotenoidler serbest radikallerle başlayan bu reaksiyonlara özellikle de lipid peroksidasyonuna engel olurlar. Bu pigment grubunun radikal süpürücü etkilerinin yanında değişik hücre dizilerinde antineoplastik ve antiproliferatif etkileri de bulunmaktadır [7, 16]. Bu pigment grubunun antikarsinojenik aktivitesini açıklamak için iki tane teori öne sürülmüştür. Bu teorilerden bir tanesi, onların vitamin A prekürsörü olmaları veya antioksidan özelliğe sahip olmalarına bağlı aktivite, bir diğeri ise likopen veya kantaksantin gibi provitamin A olmayan karotenoidlerin kanseri önleyici etkileri ile ilişkili gösterdikleri biyolojik aktivitedir [1].

Karotenoidlerin kardiyovasküler hastalıklar üzerine de etkili olduğu bilinmektedir. Bilindiği gibi düz kas hücrelerinin (smooth muscle cells- SMC) çoğalması arteriyal duvarların değişimi ile oluşan ateroskleroziste önemli rol oynar. SMC çoğalmasının inhibisyonu, karotenoidlerin aterosklerozis gelişiminde etkili olan mekanizma olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada

karotenoidlerin insan aortik düz kas hücrelerinde DNA sentezi üzerine etkisi araştırılmıştır. Likopenin β -karoten' e göre konsantarsyona bağlı olarak daha güçlü bir inhibitör olduğu ortaya çıkmıştır. Karotenoidlerin bu etkisinin muhtemel mekanizması protein kinaz C (PKC) aktivitesinin inhibisyonudur. PKC hücreyi çoğalmaya götüren sinyal transdüksiyon yolağında önemli bir habercidir. Bunun yanında hücre çoğalmasının inhibisyonu kültürde karotenoid ürünlerinin (-epoksi, -peroksi, -hidroksi türevleri) ve metabolitlerin oluşumuna ve antioksidan özelliklerine de bağlı olabileceği düşünülmektedir [16].

Karotenoidler gen ekspresyonunda etkili olabilmektedirler. Örneğin C3H/10T1/2 hücrelerinde provitamin A veya antioksidan özelliklerinden bağımsız olarak konneksin 43 gen ekspresyonunu düzenleyerek hücreler arası geçit bölgelerinde iletimi arttırabilmektedir [16].

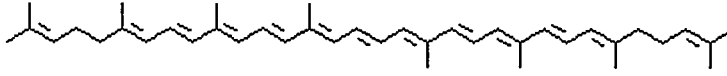
Karotenoidlerin etkilerini açıklayan diğer bir mekanizma, likopen veya zeaksantin gibi provitamin A olmayan karotenoidlerin etkisini açıklamamasına rağmen β -karoten' in provitamin A özelliğiyle ilgilidir. Öne sürülen başka mekanizma da karotenoidlerin büyüme faktörlerinin etkilerini engellemesidir [16].

2.2.1. Likopen

Likopen bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından fotosentez esnasında ışığı absorblamak ve fotosensitizasyona karşı korunmak için sentezlenen doğal bir pigmenttir. Kırmızı sebze ve meyveler likopen kaynağıdır [1, 2]. Özellikle domateste bulunan likopen, karotenoidler arasında en güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan karotenoiddir [1, 2, 7, 9, 11, 17, 18].

2.2.1.1. Likopenin kimyasal yapısı

Likopen molekülü 40 karbon atomlu, lineer sırada dizilmiş 11 konjuge ve 2 konjuge olmamış çift bağ içeren açık hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır [1, 2, 14, 17, 19]. Bu çift bağların ışık, termoenerji ve kimyasal reaksiyonlar esnasında izomerizasyona uğrayabileceği gösterilmiştir [1, 2, 19]. Likopenin tüm trans formları, 5-cis, 9-cis, 13-cis ve 15-cis formları aydınlatılmıştır [1, 2, 19]. Şekil 1' de likopenin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 1 [1] Likopenin kimyasal yapısı

Moleküler formülü $C_{40}H_{56}$, molekül ağırlığı 536,85 daltondur [1, 2]. Likopen lipofilik bir bileşik olup suda çözünmez [1, 2, 9]. Kırmızı pigment maddesidir. Polien zincirindeki uzun kromofor likopenin bu kırmızı renginden (472 nm) ve antioksidan aktivitesinden sorumludur [19]. Likopenin petrol eteri ile hazırlanan çözeltisinin görünür ışıktaki λ_{max} 'ı 472 nm ve $E\%$ 3450' dir. Likopen, β -ionon halka yapısı taşımadığı için provitamin-A aktivitesi göstermez [1].

Biyosentezi : Likopen renksiz karoten, fitoenden (7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12'-oktahidro karoten) dört desatürasyon reaksiyon serisiyle sentezlenir. Bu reaksiyonlar yüksek bitkilerin plastidlerinde meydana gelmekte ve iki membran desatürazları tarafından katalize edilmektedirler [19].

2.2.1.2. Likopen içeren besin kaynakları

Domates ve domates kaynaklı ürünler besinlerdeki likopenin % 85' inden fazlasını oluşturur [1, 2, 6, 17, 19, 20]. Karpuz, greyfurt, kayısı ve papaya diğer likopen kaynaklarıdır [1, 6, 19]. Tablo 2' de bazı sebze ve meyvelerdeki likopen miktarı verilmektedir.

Tablo 2 [1] sebze ve meyvelerdeki likopen miktarı

Meyveler / Sebzeler	Likopen ($\mu\text{g} / \text{g}$)
Domates	8,8 – 42
Karpuz	23 – 72
Guava	54
Greyfurt	33,6
Papaya	20 – 53
Kayısı	< 0,1

Domateste meydana gelen likopen miktarı domatesin çeşidine göre değişmekte ve meyvenin olgunlaşmasıyla artmaktadır [1, 2, 6]. Tüm trans formlar çiğ domatesteki likopenin izomerik formudur ve transtan cis izomerizasyonuna dönüşüm pişirme, besin üretimi ve depolama esnasında gerçekleşir [1, 2, 19]. Pişirme veya besin üretimi esnasında çok küçük miktarlarda likopen kaybı görülür [1, 2]. Domates suyu, ketçap, domates çorbası, pizza, spagetti diyetteki başlıca likopen kaynaklarıdır [1, 19]. Tablo 3' de domates ve bazı domates kaynaklı ürünlerdeki likopen miktarı verilmektedir.

Tablo 3 [1] domates ve domates kaynaklı besinlerin içerdiği likopen miktarı

Domates Ürünleri	Likopen ($\mu\text{g} / \text{g}$ ağırlık)
Taze domates	8,8 – 42
Piştirilmiş domates	37
Domates salçası	62
Domates ezmezi	54 – 1500
Domates çorbası	79,9
Domates tozu	1126,3 – 1264,9
Domates suyu	50 – 116
Pizza	127,1
Ketçap	99 – 134,4

2.2.1.3. Likopenin absorpsiyonu, metabolizması ve dokulardaki dağılımı

Likopen besinle alındıktan sonra lipid misellerle birleşip pasif difüzyonla intestinal mukozadan absorbe olduktan sonra şilomikronlarla birleşerek karaciğere taşınmak için lenfatik sisteme salıverilir. Daha sonra lipoproteinlere bağlanarak farklı organlara taşınır [1, 2]. Karotenoidce zengin gıdaların tüketilmesinden sonra bireyler arasında görülen plazma likopen seviyesindeki farklılıklar, bu bitki pigmentlerinin absorpsiyonunun ve biyoyararlanımının genetik, fizyolojik ve metabolik faktörlerden etkilendiğini göstermektedir [1, 2, 8, 17, 19]. Üretim esnasında besin matriksinden likopenin salıverilmesinde kullanılan ısı, izomerizasyonu indükleyerek tüm formların biyoyararlanımını arttırmaktadır [1, 2, 6]. Sıcakta işlenerek hazırlanan besin kaynaklarından likopen absorpsiyonu, işlenmemişlere göre daha fazladır. Yine yağ içeriği zengin diyetlerdeki likopen

absorbsiyonu da daha fazladır. İşlenmiş domatesteki likopenin biyoyararlanımının fazla olması, likopenin cis izomerlerinin biyoyararlanımının trans formundan daha fazla olduğunu göstermektedir [1, 2, 19]. Çünkü cis izomerler safra asit misellerde ve birleştiği şilomikronlarda daha fazla çözünmektedir. Her bir karotenoidin absorpsiyonu başka bir karotenoidin absorpsiyonunu antagonize etmektedir, örneğin kantaksantin likopenin absorpsiyonunu inhibe eder [19]. Bunun yanı sıra likopen, β -karoten ile birlikte alındığında, tek alınmasına göre daha fazla biyoyararlanım göstermektedir [1].

Likopen insan plazmasında bulunan en önemli karotenoid olup yaklaşık 2-3 günlük yarılanma ömrüne sahiptir. İnsan plazmasındaki likopen, izomerik karışım halindedir ve bunun yaklaşık % 50' sini cis formlar oluştururken, trans formları ise likopenin bitkilerde en çok bulunan izomeridir [1, 2]. Likopen alındıktan sonra plazmada önce çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) ve şilomikronlara, sonra düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoproteinlere (HDL) bağlanır. En yüksek seviyeleri LDL' de bulunur. Likopenin serum konsantrasyonları 50 nm – 900 nm aralığında değişmektedir [19].

Erkek ve kadınlar arasındaki serum likopen seviyesi farklılıkları önemli değildir. Kadınlarda kan likopen seviyesi menstural dönem fazlarından etkilenir. Sigara içen ve içmeyenlerin serum likopen seviyeleri karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunmamıştır. Ancak sigara içenlerde üç sigarayı takiben lipid peroksidasyonundaki % 40' lık artışla birlikte serum likopen seviyesi % 40 düşmektedir. Benzer olarak sigara dumanına invitro maruz bırakılan taze plazmada likopen ve diğer lipofilik antioksidan seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir. Alkol tüketiminin de serum likopen seviyesini değiştirdiği bulunmuştur [1].

Likopenin metabolizması hakkında bilinenler oldukça azdır. 5,6-dihidroksi-5,6-dihidro likopen, 2,6-siklolikopen-1,5-diol insan plazma ve dokusunda bulunan likopen metabolitleridir [1, 19]. Likopen oksidasyonla epoksidaz forma dönüşebilir, sonra metabolik redüksiyonla 5,6-dihidroksi-5,6-dihidro likopen oluşabilir [1]. Tüm oksijenli likopenler oksidasyon ürünüdür [19].

Likopenin insan dokularında biriktiği bilinmektedir [1, 19]. Domates suyunun uzun periyotta ve aşırı miktarda tüketimi sonunda deri ve karaciğerde

likopenemi adı verilen renklenme oluşur [1]. Likopen dağılımı bütün dokularda aynı değildir [1, 2, 19]. Dağılımdaki bu farklılıklar likopenin, özellikle prostat, karaciğer, adrenal ve testislerde yüksek miktarlarda bulunmasına neden olan spesifik mekanizmalar olduğunu göstermektedir [1, 19]. Bu dokulardaki yüksek likopen konsantrasyonuna neden olan biyokimyasal mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte bir hipoteze göre bu dokularda çok sayıda lipoprotein reseptörü bulunması ve bilindiği gibi likopeninde lipoprotein aracılığıyla taşınmasıdır [19]. Tablo 4' de doku likopen seviyeleri verilmektedir.

Tablo 4 [1] doku likopen seviyeleri

Doku	Likopen (nmol / g)
Testisler	4,34 – 21,36
Adrenal	1,9 – 21,6
Prostat	0,8
Karaciğer	1,28 – 5,72
Göğüs	0,78
Akciğer	0,22 – 0,57
Böbrek	0,15 – 0,62
Kolon	0,31
Deri	0,42
Ovaryum	0,3
Mide	0,2
Beyin sapı	Saptanmadı

Likopen diğer vücut sıvılarında da saptanmıştır. İnsan sütünde yapılan araştırmalarda 13 geometrik izomer ve 2 likopen oksidasyon ürünü dahil 34 karotenoid bulunmuştur. Kısır erkeklerde likopen ve β -karoten seminal plazma seviyesinin, normal erkeklere göre daha düşük olduğu saptanmıştır [1].

2.2.1.4. Likopen etki mekanizması

i. Antioksidan etkileri ve serbest radikallerle etkileşmesi

Biyolojik olarak önemli olan karotenoidler arasında likopen en etkili eşleşmemiş oksijen süpürücüsüdür. Likopenin bu etkisi açık zincire sahip olan likopenin son grupları siklik olan diğer biyoaktif karotenoidlere oranla daha iyi bir hedef olmasıyla açıklanmaktadır [21]. Likopen antioksidan özelliği dolayısıyla invitro olarak DNA' da oksidatif hasarı azaltır, malign duruma dönüşümü yavaşlatır ve proteinler, lipidler ve diğer hücrelerin biyolojik oksidatif hasarını azaltır. Likopenin konneksin 43 ekspresyonunu indükleyerek hücreler arasında hücrelerarası geçit bölgelerindeki iletimi arttırdığı da bulunmuştur. Hücrelerarası geçit bölgelerindeki iletimin kaybolması malign dönüşüm süresince oldukça önemlidir [2].

ii. İmmün sistem modülasyonu

Likopenin immün sistem yanıtları üzerine doğrudan stimüle edici etkisi söz konusudur [2]. Domates ürünlerinin fazla miktardaki tüketimi ile kanser oluşum riskinin azalmasına bağlı olarak likopenin immunomodülatör aktivitesi göze çarpmaktadır [21]. Bu etki, likopenin antioksidan özelliğinin, kanser ve insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) ve kazanılmış immün yetmezlik sendromuna (AIDS) karşı koruyucu rolünün temelini oluşturur [2].

Farelerde tümörjenezis süresince likopen timusta T hücre farklılaşmasını sağlayarak T-yardımcı hücrelerinin artışına neden olmaktadır. Likopenin bu etkisi immün sistem aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır [21].

Diyetlerde likopen azlığı periferal kandaki mononükleer hücrelerin (peripheral blood mononuclear cells PBMC) önemli şekilde azalmasıyla sonuçlanmaktadır. Buna ilave olarak bu hücrelerden interlökin-2 (IL-2) ve interlökin-4 (IL-4) salınımı da azalmaktadır. 2 hafta boyunca 330 mL/gün domates suyu tüketimi ile lenfosit fonksiyonları normale dönmekte ve beraberinde plazma likopen konsantrasyonu da artmaktadır. Lenfosit DNA' sı domates tüketimi ile birlikte oksidatif hasara karşı direnç kazanmaktadır. Likopenin bu etkisi sağlıklı yetişkin bireylerde 2 haftalık periyotta düşük karotenoid içeren

gıdalarla ve bunu takiben yine 2 haftalık periyotta domates suyu (40 mg/gün likopen içeren) tüketilmesiyle araştırılmıştır. Araştırma sonucunda PBMC' inde IL-2 salınımında artış ve lenfosit proliferasyonu tespit edilmiştir [21].

2.2.1.5. Likopenin biyokimyasal etkileri

i. Oksidatif etkileri

çalışmalar, likopenin etkili bir antioksidan ve radikal süpürücüsü olduğunu göstermiştir [1, 2, 7, 9, 11, 14, 17, 18]. Yapılan bir çalışmada likopenin β -karotenden iki kat ve α -tokoferolden on kat daha etkili bir serbest radikal süpürücü olduğu saptanmıştır [2]. Likopen, sahip olduğu konjuge dien sayısının fazla olması nedeniyle doğal karotenoidler arasında en güçlü eşleşmemiş oksijen süpürücüsüdür [1, 2, 19]. Karotenoidler, serbest radikallerle başlayan reaksiyonlara özellikle de lipid peroksidasyonuna engel olurlar ve tüm karotenoidler trolox' a eşdeğer antioksidan kapasiteye (TEAC) sahiptirler [1, 2, 19].

Likopenin hidrojen peroksiti ve nitro katyonunu (NO_2^+) inaktive ettiği görülmüştür [1, 2]. Son yapılan çalışmalarda, likopenin NO_2^+ radikalinin sebep olduğu hücre zarı hasarına ve hücre ölümüne karşı lenfositlerin korunmasında β -karoten' den daha etkili olduğu bulunmuştur [1, 2, 10, 16]. Likopen aşırı derecede hidrofobik bir madde olduğu için hücre membranlarına ve diğer lipoprotein bileşenlerine daha çok yerleşmekte ve bu özelliğinden dolayı ROT' la etkileşmesinin lipofilik ortamda daha fazla olması beklenmektedir [1, 2].

Likopen lipid, DNA ve lipoproteinlerdeki oksidatif hasara engel olmaktadır [6, 12]. Fotosensitif oksidatif hasara karşı insan LDL' sini koruyucu özelliği vardır [1, 12]. Dokulardaki oksidatif zararın azalmasında likopenin baskılayıcı rolünün β -karoten' den daha fazla olduğu öne sürülmektedir [1, 10, 12]. Hücre kültürü ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, likopenin tümör hücre büyümesi ve proliferasyonunda α - ve β -karoten' den daha güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu gözlenmiştir [6]. UV ışınları ve sigara içmeye karşı likopenin koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir [6, 12, 14]. Deride bulunan likopenin UV

ışığına maruziyet esnasında β -karoten' den daha fazla yok olduğu bulunmuştur [1, 10, 12].

Yapılan çalışmalarla, likopenin bazı kanser hücre dizilerinde DNA sentezi inhibisyonunda, makrofaj hücre dizilerinde kolesterol sentezi inhibisyonunda ve büyüme faktörlerinin sinyal transdüksiyon mekanizmalarında araya girip sinyal iletimini engellemede β -karoten' den daha etkili olduğu saptanmaktadır [16].

ii. Nonoksidatif etkileri

Karotenoidlerin kanser gelişimine karşı koruyucu etkilerinin temelinde hücreler arasındaki hücrelerarası geçit bölgelerindeki iletimi indüklemeye yeteneğinin olduğu ileri sürülmektedir [1, 2]. Aynı şekilde likopenin de sağlığa yararlı etkilerinin, onun antioksidan özelliğinin yanı sıra hücrelerarası geçit bölgelerindeki iletim mekanizmasından da kaynaklandığı düşünülmektedir [17, 18]. Likopenin kanser gelişimine karşı koruyucu etkisinin temeli olan bu hücrelerarası geçit bölgelerindeki iletim onun sahip olduğu antioksidan özelliğinden bağımsızdır [19, 21]. Yapılan çalışmalarla hücrelerarası iletimi likopenin arttırdığı gözlenirse de bu etkinin β -karoten' den veya kantaksantin' den daha önemsiz olduğu saptanmıştır [1].

2.2.1.6. Likopenin insan sağlığındaki rolü

Likopenin insan sağlığındaki potansiyel rolü, değişik hücre kültürlerinde antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesi, hayvan modellerindeki antitümöral etkisi ve epidemiyolojik çalışmaları kapsayan üç değişik yöntem kullanılarak araştırılmış ve giderek değer kazanmaya başlamıştır. Likopenin sahip olduğu bu etki üç farklı yöntemle araştırılır. Bunlardan biri anti hücre proliferatif aktivitesini araştırmak için farklı hücre dizileri kullanılarak yapılan doku kültürü çalışmaları, bir diğeri likopenin antitümör özelliğini göstermek için hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar ve son olarak risk ve kontrol gruplarında yapılan epidemiyolojik çalışmalardır [1].

i. Doku kültürü çalışmaları

Doku kültür sistemlerinde elde edilen veriler, likopenin normal ve malign hücre dizilerinde moleküler ve biyokimyasal etkileri için oldukça önemli kanıtlar sunmaktadır [1]. Tablo 5' de likopenin farklı hücrelerde gösterdiği etkiler verilmektedir.

Tablo 5 hücre kültürü çalışmalarında likopenin farklı hücrelerde gösterdiği etkiler

Hücre Tipi	Önemli Bulgular
HL-60 insan lösemi hücre dizisi [22]	Likopen (10 µmol/L) hücre bölünmesinde % 40 azalmaya sebep oldu.
HL-60 insan lösemi hücre dizisi [1]	Likopen retinoik asitin farklılaştırıcı etkisini arttırdı.
C3H/10T1/2 fare embriyosu fibroblast hücre dizisi [23]	Malign dönüşümün inhibisyonu
C3H/10T1/2 fare embriyosu fibroblast hücre dizisi [24]	Artan konnexin 43 gen ekspresyonu
Rat karaciğer hücreleri [25]	Azalan karbontetraklorür zehirlenmesi
Fare karaciğer hücreleri [1]	Mikrosistin ile oluşan karaciğer tümörlerine karşı koruyucu etki
Raji hücreleri [1]	Gen aktivasyonu inhibisyonu
İnsan kanser hücre dizileri Endometrial (Ishikawa), meme (MCF-7), akciğer (NCI-H226), normal fibroblast [26]	Likopen kanser hücrelerinin büyümesini baskımlarken normal fibroblastları etkilemedi
J774A.1 makrofaj hücre dizisi [27]	HMGCoA redüktaz inhibisyonu ile azalan kolesterol sentezi
PC-3, DU145, LNCaP insan kanser hücre dizisi [13]	Kanser hücrelerinin azalan yaşayabilme yeteneği

ii. Hayvan alışmaları

Hayvan modelleri, likopenin biyokimyasal reaksiyonlarını araştırmak için elverişli sistemlerdir [1]. Tablo 6' da hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda elde edilen bazı bulgular verilmektedir.

Tablo 6' da hayvan model sistemleri kullanılarak yapılan alışmalar

Hayvan Modeli	Önemli Bulgular
Fareler [1]	Yaşam süresini uzattı
Fareler [1]	Bakteriyal infeksiyonlara karşı direnci arttırdı
Rat beyin tümör hücreleri ile aşılanmış Wistar ratlar (Glioma hücreleri) [28]	Tümör hücrelerinin gelişimini ve büyümesini inhibe etti
SHN bakire fare hücrelerinde meme tümörü [29]	Tümör büyümesini azalttı ve hastalığı geciktirdi
Spragu – Dowley ratları [30]	N- metilnitrosüre (MNU) ile indüklenen kolonik ACF' yi (anormal crypt foki) azalttı
Spragu – Dowley ratları [31]	Dimetilbenzantrazenin (DMBA) sebep olduğu meme tümörlerini azalttı
B6C3F ₁ fareleri [32]	Erkek farelerde dimetilhidrazin (DMD) ile indüklenen akciğer adenomalarını azalttı
SPF Wistar ratlar [33]	Dimetilbenzbenzantrazenin (DMBA) sebep olduğu karaciğer preneoplastik fokileri azalttı
B6C3F ₁ fareleri [1]	Dimetilhidrazinin (DMH) sebep olduğu kolonik karsinogenezis üzerine etkili değildir
Fischer 344 ratlar [34]	Domates suyu N-butilN-(4-hidroksibutil)nitrosaminin (BBN) sebep olduğu mesane karsinogenezisini inhibe etti

Yavru erkek ratlar [35]	Aflatoksin B ₁ ' in sebep olduğu karaciğer preneoplastik foki üzerine etkili değildir
Fareler [36]	Meme bezleri ve akciğerde karsinogenezisi inhibe etti
Ratlar [36]	Karaciğer karsinogenezisini inhibe etti

iii. Epidemiyolojik çalışmalar

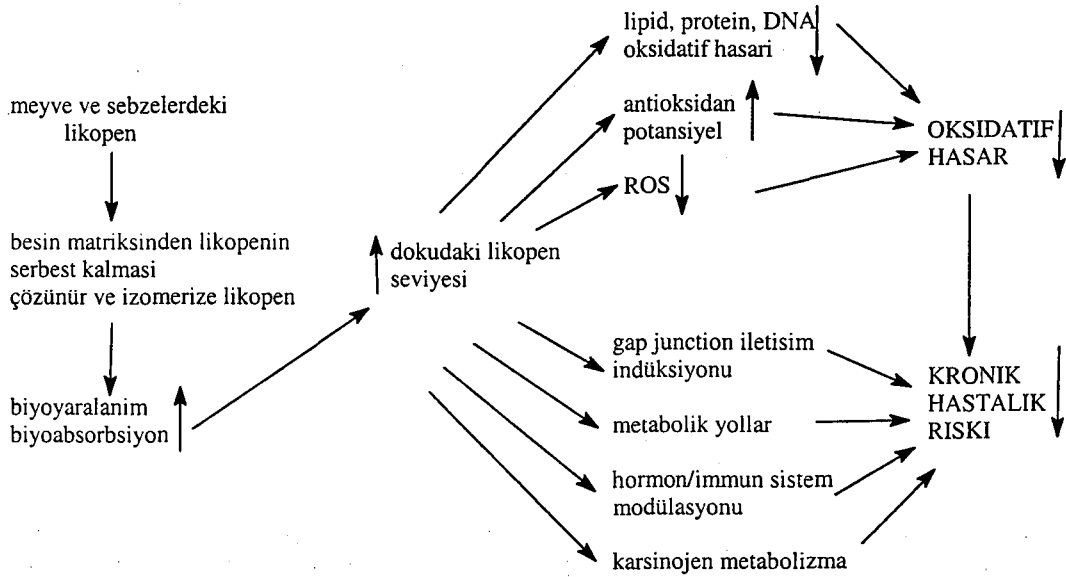
Likopenin kronik hastalıklara karşı potansiyel koruyucu rolü normal ve riskli gruplarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konulmuştur. Mevcut bilgiler, geniş ölçüde kronik hastalıklardaki plazma değerlerinden elde edilen verilere dayanmaktadır. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, kanser ve diğer kronik hastalıklara yakalanma riskinin sebze ve meyve ağırlıklı beslenme ile azalabileceğini göstermektedir [1]. Tablo 7' de likopen ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar verilmektedir.

Tablo 7 likopen ve kronik hastalıklar arasındaki ilişkiyi gösteren epidemiyolojik çalışmalar

Çalışılan Kanser Tipi	Önemli Bulgular
Prostat kanseri [37]	Domates ürünlerinin tüketimi prostat kanseri riski ile ters orantılıdır
Durum kontrol çalışması	Fazla domates tüketimi dijestif doku kanserinin tüm tiplerinin riskini azalttı
Dijestif doku kanseri [38]	
Durum kontrol çalışması	Sadece likopen tüketimi servikal kanser riski ile ters orantılıdır
Servikal kanser [39]	
Durum kontrol çalışması	Artan serum likopen seviyesi ile kanser riski azalmıştır
Mesane kanseri [40]	
Durum kontrol çalışması	Serum likopeni ve göğüs kanseri riski ters ilişkidir
Göğüs kanseri [1]	
Durum kontrol çalışması	Düşük kalp krizi riski
Miyokardial infaksiyon [1]	

Farklı bölge popülasyonlarında kronik kalp hastalıklarında ölüm oranı [1]	Düşük serum likopeni kalp hastalıklarından ölüm riskinin artmasına neden oldu
HIV pozitif kadınlar ve infekte olmuş çocuklar [41 – 42]	Hasta gruplarda çok düşük likopen seviyesi saptanmıştır.
Serebrovasküler hastalık riski taşıyan yaşlı popülasyonlar [43]	Yüksek riskli bireylerde çok düşük likopen seviyesi tespit edilmiştir.
Prostat kanseri [18]	Kanser gelişen hastalarda serum likopen seviyesi düşüktür

Likopenin insan sağlığına olan etkilerinin daha iyi anlaşılması için daha pek çok çalışma gerekmektedir. Şekil 2 bugünkü bilgilere dayanarak insan sağlığında likopenin rolünü özetlemektedir [1].



Şekil 2 [1] likopenin insan sağlığındaki rolü

Likopen bazı kanser türleri ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu özelliğe sahiptir [2, 5, 6, 13-16, 19, 20]. Likopenin serviks, özafagus, mide, mesane, kolon, rektum, prostat ve akciğer gibi çeşitli kanser türlerine karşı

koruyucu olabileceği gösterilmiştir [6, 14, 20]. Likopen tüketiminin artması ile prostat ve deri kanseri riskinin azaldığını gösteren kanıtlar mevcuttur [1, 5, 13, 15, 20].

Likopen, kanser ve kronik kalp hastalıklarına yakalanma riskinin azalmasında ümit verici bir besinsel bileşendir [19]. Son olarak uzun süreli insan araştırmaları, kanser ve koroner kalp hastalıkları için risk taşıyan popülasyonlarda gerçekleştirilecektir [1]. İnsanlarda kronik hastalıkların çaresinin bulunmasında, etkili gıda strateji çalışmalarından elde edilen sonuçlar temel alınarak ileriki çalışmalarda likopen içeren besinlerin artan tüketimine odaklanılacaktır [1, 19].

2.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler ve Hücreler Hakkında Genel Bilgi

2.3.1. Çalışmada kullanılan yöntemler hakkında genel bilgiler

2.3.1.1. Tümör Nekroz Faktör (TNF)

İmmün sistem tarafından üretilen ve sitotoksik aktiviteye sahip olan endojenlere sitokin adı verilmektedir. Sitokin familyasından olan tümör nekroz faktörün (TNF) TNF- α (kaşektin) ve TNF- β (lenfotoksin) olmak üzere iki farklı tipi vardır. Her iki molekülde aynı reseptörlere bağlanmasına ve benzer biyolojik aktiviteleri indüklemesine rağmen sınırlı bir homoloji gösterir. İnsan TNF- α ve - β genleri 6. kromozomda yerleşmiştir [44]. Son zamanlarda α -TNF için TNF, β -TNF için lenfotoksin kelimeleri tercih edilmektedir.

En önemli TNF kaynağı aktive edilmiş mononükleer fagositlerdir. Birincil kaynak makrofajlardır, ancak antijenle stimüle edilmiş NK hücreleri ve mast hücrelerinden de bu protein salgınır.[45].

Tablo 2. 8. [45] İnsanlarda TNF- α ' nın majör hücrel kaynakları

Makrofajlar	Polimorfonükleer lökositler
NK hücreleri	Astrositler
Eozinofiller	Langerhans hücreleri
Hepatik Kupffer hücreleri	Beyin mikrogial hücreleri
Glomerüler mezangial hücreler	Değişik transforme hücreler
Fibroblastlar	B ve T lenfositleri

Bu majör hücrel kaynaklardan makrofajların, çok fonksiyonlu hücreler oldukları için nonspesifik savunma sisteminde özel bir konumu vardır. Makrofajların fagositoz yeteneğine sahip oldukları ve indüksiyon ile oldukça aktif efektör hücrelere dönüştükleri gösterilmiştir [46].

Makrofajlar savunma sisteminde mikrobiyal enfeksiyonlara ve tümörlere karşı önemli rol oynamaktadırlar. Bu hücrelerin selektif stimülasyonu, hem immün savunmada aktive edilmiş makrofajların fonksiyonunu aydınlatmada, hem de terapötik uygulamaların geliştirilmesini sağlamak amacıyla önemlidir [47].

İnsan TNF- α ' sı plazma membranına bağlı 223 aminoasitli bir polipeptid olarak sentezlenir. Daha sonra 76 ve 77. aminoasitler arasında proteolitik yarıma meydana gelerek 157 aminoasitli (17 kDa) TNF- α polipeptidi oluşur [47].

Makrofajlar bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) ile stimüle edildiğinde TNF üretimini uyarırlar. Gram (-) bakteriler tarafından LPS ile stimüle edilmiş makrofajlardan TNF sentezinin artması T hücreleri ve NK hücrelerinin IFN- α üretimini artırır [47]. Tablo 9' da TNF- α ' nın sentezini arttıran majör fizyolojik etkenler verilmektedir.

Tablo 9 [45] TNF - α ' nın üretimini indükleyen majör fizyolojik etkenler

Lipopolisakkarit	Çeşitli virüsler
Mycobacteria	Parazitler
Antikor – antijen kompleksleri	Çeşitli sitokinler (IL- 1)
İnflamatuar mediyatörler	TNF- α (otokrin aktivite)
Bakteriyel enterotoksin	

TNF- α özellikle gram(-) bakterilere karşı cevap oluşumunda, çeşitli tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitede ve septik şok, kaşeksi ve anoreksi gibi patolojik olaylarda rol oynar [45].

TNF - α 'nın immün sistem üzerine etkileri;

- Makrofajlar, nötrofiller ve polimorfonükleer lökositler gibi çeşitli fagositik hücrelerin aktivasyonu
- Patojenlere karşı makrofajların ve eozinofillerin toksisitesinin artırılması
- Sınıf I interferonlara benzer şekilde antiviral aktivite
- T lenfositlerine bağlı interlökin-2 (IL-2) proliferasyonunun artırılması

- TNF ayrıca inflamatuvar cevabın oluşumunda önemli rol oynar ve bu TNF' in en önemli fizyolojik aktivitesidir [45].

TNF- α transforme olmuş hücreler üzerine çok büyük oranda sitotoksik etki gösterir. Ancak tüm tümör hücre tiplerinin ölümünü indükleyemez. TNF- α apoptosis ve nekrosis yolu ile duyarlı hücrelerin ölümüne aracılık eder [45]. Antitümör etkisinin doza bağlı olduğu ve lokal verilişte (tümör içine) en iyi sonuçların alındığını belirten TNF ile sistemik uygulamada da tümörde iyileşme gözlenmiştir. TNF' in interferonlarla birlikte bulunması halinde sitotoksik etkisinin arttığı gösterilmiştir. Diğer endojen faktörler ile etkileşme sitotoksik etkisini arttırabilir [48].

Aşağıdaki nedenlerle TNF' e antikanser bir ajan olarak gösterilen ilgi azalmıştır.

- Birçok tümör çeşidi TNF' in gerçekleştirdiği harabiyete duyarlı değildir.
- Bazı tümör hücreleri TNF' i otokrin bir büyüme faktörü olarak sentezler.
- TNF' in majör biyolojik aktivitesi tümör hücre nekrozu değildir.
- Bu sitokin sistemik olarak terapötik dozda uygulandığında genellikle şiddetli yan etkiler gelişir [45].

Son yıllarda yapılan çalışmalarla TNF- α ' nın endojen bir promoter ve kanser gelişiminde bir mediyatör olduğuna dair inanç artmaktadır [49, 50, 51]. Buna göre herhangi bir bileşik tarafından TNF- α ' nın salımının inhibisyonu tümör gelişiminin inhibisyonunda önemli rol oynar [52].

2.3.1.2. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Testler ve MTT

İn vitro çalışmalarda hücre sayısının ifade edilmesini sağlayan değişik biyolojik ölçümler vardır. MTT hücre proliferasyon ölçümü hücre proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksitesiyi ölçmede kullanılan kantitatif kolorimetrik yöntemdir. Bu tekniğin mitokondriyal enzim sistemleri tarafından katalize edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayandığı ve hücre büyümesi ve ksenobiyotik sitotoksitesiyini yansıttığı bildirilmiştir. Her ne kadar kolay uygulanabilir ve kolaylıkla otomatize edilebilir olsa da belirli faktörler tarafından etkilenmektedir [53].

Yaşayan hücreler bazı vital boyalar kullanılarak boyanabilmektedir, ancak yıkama basamakları hem süreyi uzatmakta hem de hata payını arttırmaktadır. ELISA cihazı (çok kuyucuklu plaka okuyucu) çok miktardaki örneği, yüksek oranda doğrulukla okuyabilir böylece kullanılan renk reaksiyonunu yaşayan hücre sayısı olarak değerlendirebilme imkanı sağlar. Bu tür kolorimetrik ölçümlerde ideal olan renksiz substratlar kullanarak yaşayan hücrelerden renkli ürünler elde etmektir. Tetrazolyum tuzları bu amaçla kullanılan, substrat olarak renksiz, yaşayan hücrelerin aktif mitokondrilerinde renkli ürünler veren maddelerdir. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) bu amaçla kullanılan tetrazolyum tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzlarını oluşturur. Formazan tuzları organik solventlerde (DMSO, izopropanol gibi) kolayca çözünürler. Solventte çözünen materyalin optik dansitesi, çözülmüş olan boyanın konsantrasyonunun verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçülen değer direkt olarak kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini verir, bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir [54]. Bu yöntem hızlı, kolay ve çalışma basamaklarının az olması ve 96 kuyucuklu plaka ile çalışma imkanı olması açısından çok sayıda örnekle çalışma imkanı veren bir testtir [55].

Süksinat dehidrojenaz, Krebs siklusunun mitokondri membranında olan tek enzimdir ve süksinatı fumarata katalizler. Krebs siklusunun diğer tüm enzimleri solubl fazdadır. Yapısal analogu olan malonat, süksinat dehidrojenazın kompetitif inhibitörüdür [56].

2.3.1.3. BrdU (5-bromo-2'-deoksiüridin) Proliferasyon Ölçümü

Hücre kültürlerinde DNA sentezinin kantitatif olarak belirlenmesi laboratuvar rutin bir prosedürdür. olarak hücrelerde büyüme faktörleri, ekzojen faktörler, ilaçlar, diğer ajanlar, hormon ve reseptör aktivitesinin DNA sentezine ve/veya hücre proliferasyonuna etkileri araştırılmaktadır. Radyoaktif ³H-timidin ile yeni sentezlenen DNA'nın tespiti kullanılmakla birlikte bu yöntemin zararları, güvenilirliği ve radyoaktif materyallerin temizliğinin güç olması gibi nedenlerden

dolayı DNA sentezinin ve/veya hücre proliferasyonunun ölçülmesinde radyoaktif olmayan teknikler geliştirilmiştir [57, 58]. Bu amaçla tetrazolyum tuzları ile mitokondriyal aktivitenin ölçümü, hücresel asit fosfataz aktivitesinin ölçümü, kristal viyole ile boyama gibi yöntemler hücre proliferasyonunun belirlenmesinde geliştirilen ve radyoaktif olmayan metodlardır. Benzer şekilde, timidinin kimyasal analogu olan bromodeoksiüridin ve DNA sentezinin ölçülmesinde kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir [57, 58, 59].

BrdU replike olan hücrelerin DNA' sına girdiğinde replikasyon esnasında timidinin yerini alarak DNA' nın yapısına girmektedir [58, 59, 60]. Sonra BrdU kendisi için spesifik monoklonal antikorlarla (anti-BrdU antikor) tespit edilmektedir [58, 59]. S-fazı boyunca hücrelerin immunohistokimyasal belirlenmesi ve hücre proliferasyonunun ölçülmesi mikroskopik veya hücre örneklerinin sitometrik akış analizi ile yapılmaktadır [60]. Hücre içindeki BrdU miktarı çoğalan hücre miktarı ile orantılıdır ve fikse olan hücrelerde direk ELISA ile hesaplanabilmektedir [59].

2.3.2. Deneylerde Kullanılan Hücreler Hakkında Genel Bilgiler

2.3.2.1. NIH3T3 fibroblast hücreleri

S.A. Aarson tarafından stoklanan NIH Swiss fare embriyosundan elde edilen kontakta inhibisyona duyarlı adherent fibroblast hücreleridir. Özellikle DNA transfeksiyonu ve transformasyon çalışmaları için kullanılmaktadır. Kültürdeki hücrelerin normal çalışması için haftada bir kez yüzeyi tamamen kaplanmadan pasajlanmalıdır [61].

2.3.2.2. HeLa serviks adenokarsinomu

31 yaşında zenci bir kadından alınarak W.F. Scherer tarafından stoklanan adherent ve epitelyal serviks adenokarsinom hücreleridir. P53 ekspresyonu düşük olarak tespit edilmiştir. Test edilen 1385 hücrenin tümü anöploididir [61].

2.3.2.3. LNCaP prostat kanser hücresi

1977 yılında Horoszewicz ve arkadaşları tarafından 50 yaşında Kafkasyalı bir erkeğin sol supraklavikular lenf nodundan izole edilen adherent ve epitelyal hücrelerdir. Bu hücreler 5- α -dihidrotestosterona (büyüme modülasyonu ve asid fosfataz üretimi) duyarlıdır. Çok yavaş büyürler. Androjen ve östrojen reseptör pozitifdir. Hücresel ürünleri insan prostatik asid fosfataz ve prostat spesifik antijendir [62].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Hücreler

TNF, MTT, BrdU testlerinde HeLa epitelyal insan serviks adenokarsinoma hücreleri, NIH-3T3 fare fibroblast hücreleri ve LNCaP epitelyal insan sol supraklavikular lenf nod karsinoma hücreleri kullanıldı. Makrofaj hücreleri sıçanlardan elde edildi.

3.1.2. Kimyasal Madde ve Çözeltiler

Bidistile su*

Dimetilsülfoksit (DMSO) Sigma

Formaldehit Merck

Fosfat tuz tamponu (PBS) Biological Ind.

Glasiyel asetik asit Sigma

Etanol

Hücre proliferasyon ELISA, BrdU (colorimetric) kiti Roche

Sülfürik asit Merck

Kalsiyum klorür Sigma

Likopen Sigma

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolümbromür) Sigma

Nötral kırmızı boyası Sigma

Sodyum bikarbonat Carlo Erba

Tetrahidrofuran (THF) Sigma

Tiyoglukolat Sigma

*Bidistile su laboratuvarımızda hazırlandı ve cam şişe içinde saklanmıştır.

3.1.3. Kültür Ortamı Çözeltileri

a) RPMI- 1640 Medium (2 g/L NaHCO₃, L- Glutaminsiz) Sigma

b) Hepes (1 M)(50 x) [N-2-Hidroksietilpiperazin-
N'-2-etanolsülfoksit] Sigma

c) Mem-Vitamin (100 x)	Sigma
d) NEAA (100 x) Esansiyel olmayan amino asit Solüsyonu	Sigma
e) Penisilin / Streptomisin – 10.000 U /10.000 µg / ml	Biological Ind.
f) L- Glutamin (20 mM)	Sigma
g) FCS (Fetal buzağı serumu)	Biochrom AG
h) DMEM (Dulbecco' s MEM)	Biological Ind.
i) Tripsin- EDTA (10x)	Biological Ind.
j) Puck' s Saline A	

a, b, d, h ve j sıralamalı çözeltiler buzdolabında (+4 °C), c, e, f, g ve i sıralamalı çözeltiler derin dondurucuda (-70 °C) saklanmıştır.

3.3.4. Kullanılan Cihazlar

Steril çalışma kabini	Holten
Karbondioksit inkübatörü	Heraeus
Soğutmalı santrifüj	Heraeus
İnverted mikroskop	Olympus CK ₂
ELIZA cihazı	Biotek EL _x 808
Otoklav	Hirayama
Kuru hava sterilizatörü	Haraeus
Ayarlanabilir hacimli dijital mikropipet (0,5-10 µL, 10-100 µL ve 100-1000 µL' lik)	Eppendorf
Dijital çok kanallı pipet (12 kanallı)	Eppendorf
Tekrarlayıcı pipet	Eppendorf
Pipetör	Eppendorf

3.3.5. Kullanılan Malzemeler

Polistiren doku kültür şişesi (25 ve 75 cm ² ' lik)	TPP
96 kuyucuklu plaka	Corning
Steril polipropilen santrifüj tüpü (50 ml' lik)	TPP
Steril cam pipet (1, 2, 5, 10, 25 cc' lik)	Isolab
Steril otomatik mikropipet ucu (10 µL, 100 µL' lik)	Eppendorf

Steril enjektör ucu filtresi (0.22 µL ve 0.45 µL' lik)	Orange Scientific
Tekrarlayıcı pipet ucu	Eppendorf
Neubauer lamı	Isolab

3.2. Yöntem

3.2.1. Likopen Çözeltilisinin Hazırlanması

5 mg likopen (Mol. Ağ.: 536.9) 50 mM olacak şekilde 186.25 µL THF' da çözüldükten sonra 10 µL' olacak şekilde tek kullanımlık olarak viallere konuldu ve azot tankında (-198⁰ C) depolandı.

3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu bölümde likopenin değişik konsantrasyonlarda (1.28 µM, 3.2 µM, 8 µM, 20 µM ve 50 µM) HeLa, LNCaP ve NIH3T3 hücrelerinde MTT ve BrdU proliferasyon testleri ve TNF testi için makrofajların üzerine uygulanarak etkisi araştırıldı.

3.2.2.1. Besiyeri Hazırlanması

i) Tam medyum hazırlanması:

500 ml RPMI- 1640 medyum (steril) içine aşağıda verilen çözeltiler ilave edildi.

a) Hepes - tampon çözelti (1 M) (10 X)	10 ml
b) MEM – Vitamin (100 X)	5 ml
c) NEAA (100X)	5 ml
d) Penisilin / Streptomisin (10.000 U /10.000 µg / ml)	5 ml
e) L – Glutamin (200 mM)	10 ml
f) FCS	50 ml

FCS ilave edilmeden önce 1 saat 56⁰ C' de su banyosunda inaktive edildi. Bütün maddeler 0.22 µm çapında enjektör filtresinden süzülerek ilave edildi.

Hazırlanan besiyeri 50 ml' lik steril şişelere konularak kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-70 °C) saklandı.

ii) % 10 FCS'li DMEM medyum hazırlanması:

100 ml medyum için;

a) DMEM (10X)	10 ml
b) Penisilin / Streptomisin (10.000 U /10.000 µg / ml)	1 ml
c) FCS	10 ml
d) % 7.5 NaHCO ₃	4,2 ml
e) Distile su	K.m. 100 ml

a, b, c ve d çözeltileri karıştırıldıktan sonra 100 ml' ye distile su ile tamamlandı. Kullanıncaya kadar hazırlanan besiyeri buzdolabında (+4 °C) saklandı.

3.2.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Deneylerde kullanılan HeLa, LNCaP ve NIH3T3 hücrelerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2 – 3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapıldı.

- i) İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltilisine geçmesi sağlamak için hafifçe çalkalandı ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atıldı.
- ii) Hücrelerin yıkanması için kültür şişesine 5 ml PBS ilave edilerek yıkandı ve yıkama çözeltilisi ortamdan uzaklaştırıldı.
- iii) Kültür şişesine tripsin EDTA çözeltilisi (1X) (75 cm², lik kültür şişelerine 3-5 ml, 25 cm², lik 1-3 ml) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk bekletildi (% 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C).
- iv) İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine 20-25 ml besiyeri ilave edilerek hücreler süspansedildi ve 1:2, 1:3 bölünerek yeni kültür şişelerine alındı.
- v) Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakıldı (% 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C).

1X Tripsin- EDTA çözeltisi hazırlanması (100 ml için)

Puck' s Saline A (10X)	10 ml
% 9.2' lik NaHCO ₃	0.38 ml
Tripsin- EDTA (10X)	10 ml
Steril distile su	k.m. 100 ml

3.2.2.3. HeLa, LNCaP, NIH3T3 Hücre Kültürü

- i) İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesi sağlanmak için hafifçe çalkalandı ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atıldı.
- ii) Kültür şişesine tripsin-EDTA çözeltisi (1X) (75 cm²' lik kültür şişelerine 3-5 ml, 25 cm²' lik 1-3 ml) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk. bekletildi. (% 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C).
- iii) İnkübatörden alınan kültür şişelerinin içine besiyeri ilave edilerek (ilave edilen tripsin-EDTA çözeltisinin en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi) pipet yardımıyla santrifüj tüpünde alındı.
- iv) Santrifüj tüpü içindeki hücre süspansiyonu çalkalandıktan sonra 20 µL alınarak Neubauer odacığında sayıldı ve konsantrasyon 2.10⁵ hücre / ml olacak şekilde ayarlandı.
- v) Hücre süspansiyonu küvetlere alınmış ve 100 µL/göz olacak şekilde hücre kültür plakasına dağıtılarak (2.10⁴ hücre/100 µL) 24 saat inkübasyona bırakıldı (% 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C).

3.2.2.4. Sitotoksisite Testleri

i) Tümör Nekroz Faktör (TNF) Testi [47]

Makrofaj hücrelerini elde etme yöntemi

Sıçana % 3' lük 5 ml tiyoglukollat çözeltisi (RPMI- 1640 medyum içinde hazırlanmıştır) intraperitoneal olarak verildi ve 4 gün sonra enjeksiyon yapılan hayvanların karın boşluğu açılarak steril bir enjektör ile 10 ml soğuk fosfat

tamponu (magnezyumsuz ve kalsiyumsuz) sıçanın karın boşluğuna enjekte edildi. Enjektör çıkarılmadan 5 dk lavaj yapıldıktan sonra aynı enjektörle verilen tampon çözelti geri çekildi ve böylece makrofaj hücreleri elde edildi.

Makrofaj hücre kültürü

- a) Makrofaj hücrelerini içeren tampon çözeltiden 20 μ L alınarak Neubauer odacığında sayıldı ve ml' ye düşen hücre sayısı hesaplandı.
- b) Bir santrifüj tüpüne alınan tampon çözeltisi santrifüj edildi.

Santrifüj koşulları

Devir sayısı : 1200 devir / saniye

Isı : 10 $^{\circ}$ C

Süre : 10 dk

Fren hızı : 6

- c) Santrifüjden alınan makrofaj hücrelerini içeren tampon çözeltinin üst kısmı atıldıktan dibe çöken makrofaj hücrelerinin üzerine konsantrasyon 1.10^6 hücre / ml olacak şekilde besiyeri ilave edilerek pipetleme yapıldı.
- d) Elde edilen makrofaj hücre süspansiyonu her göze 100 μ L olacak şekilde hücre kültür plakasına dağıtılarak (1.10^5 makrofaj / 100 μ L) inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı (% 5 CO₂, % 95 nem ve 37 $^{\circ}$ C).

Makrofaj hücreleri üzerine test maddelerinin verilmesi

- a) İnkübatörde 24 saat bekleyen makrofaj kültürlerinin üst kısmı tabana yapışmayan hücrelerin atılması için plaka ters çevrilerek döküldü.
- b) Plakanın her gözüne 100' er μ L besiyeri ilave edildi.
- c) Makrofajların üzerine sırasıyla likopen (besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan 1.28 μ M-3.2 μ M-8 μ M-20 μ M ve 50 μ M ve dozlarda), β -karoten (besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan 1.28 μ M-3.2 μ M-8 μ M-20 μ M ve 50 μ M ve dozlarda), THF (likopenin çözücüsü, 1 ml' de 1 μ l olacak şekilde), DMSO (β -karoten' in çözücüsü, 1 ml' de 1 μ l olacak şekilde) ilave edildi.

- d) Üzerlerine test edilecek likopen ve β -karoten çözeltisi verilen makrofaj kültürleri 24 saat inkübasyona bırakıldı (% 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C).

Makrofaj kültürlerinin üst kısmının HeLa, LNCaP ve NIH3T3 hücreleri üzerine aktarılması

- a) 24 saat sonunda inkübatörden alınan makrofaj kültürlerinin üst kısımları HeLa, LNCaP ve NIH3T3 (bölüm 3.2.2.3.' de anlatıldığı gibi hazırlanmış) hücrelerinin üzerine aktarıldı.
- b) Plaka 18 saat süre ile inkübasyona bırakıldı (% 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C).

HeLa, LNCaP ve NIH3T3 hücrelerinin boyanması

- a) İnkübatörden alınan plakada ölü hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması için ters çevrildi.
- b) Plaka fosfat tamponu (200 μ L, 37 °C) ile yıkanarak, yıkama çözeltileri ortamdan uzaklaştırıldı.
- c) Her göze 200 μ L nötral kırmızısı boyası ilave edilerek plaka inkübasyona bırakıldı (% 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C). (Nötral kırmızısı boyasının stok solüsyonu 0,4 gr nötral kırmızısına 100 ml distile su ilave edilip membran filtre ile steril edilerek hazırlandı. Çalışma solüsyonu, 1:100 oranda stok solüsyonun RPMI içinde seyreltilmesiyle hazırlandı.)
- d) 3 saat sonunda inkübatörden alınan plaka nötral kırmızısı boyasının ortamdan atılması için ters çevrildi.
- e) Plaka tekrar her göze 200 μ L formaldehit/kalsiyum klorür (CaCl₂) çözelti kullanılarak yıkandı.
- f) Absorban kağıt üzerine alınan plaka tamamen kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi.
- g) Kuruduktan sonra plakanın her gözüne 100 μ L asit – etanol çözeltisi ilave edilerek 15 dk oda ısısında bekletildi.
- h) Süre sonunda plaka el yardımıyla hafifçe boyanın çözünmesi için çalkalandıktan sonra ELISA' da 540 nm' de okundu.

Formaldehit / Kalsiyum Klorür (CaCl₂)çözeltisinin hazırlanması

Formaldehit (% 37)	1.3 ml
% 10 Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	10 ml
Distile su	89 ml

Asit / Etanol çözeltisinin hazırlanması

Glasiyel asetik asit	1 ml
% 50 Etanol	100 ml

ii) MTT Testi [53, 54, 55, 63, 64]

- Bölüm 3.2.2.3.' de açıklandığı gibi hazırlanan HeLa, LNCaP ve NIH3T3 hücre kültürlerinin üst kısmı tabana yapışmayan hücrelerin atılması için ters çevrilerek döküldü.
- Hücre kültür plakasının gözlerine sırasıyla likopen (besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan 1.28 µM-3.2 µM-8 µM-20 µM ve 50 µM ve dozlarda), β-karoten (besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan 1.28 µM-3.2 µM-8 µM-20 µM ve 50 µM ve dozlarda), THF (likopenin çözücüsü, 1 ml' de 1 µl olacak şekilde), DMSO (β-karoten' in çözücüsü, 1 ml' de 1 µl olacak şekilde) ilave edildi.
- 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra hücre kültürlerinin üst kısmı ters çevrilerek atıldı.
- Her bir göze 100 µL MTT çalışma solüsyonu ilave edildi. 3 saatlik inkübasyon süresinden sonra inkübatörden alınan plaka ters çevrilerek MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. (MTT stok çözelti, 5 mg/ml MTT fosfat tuz tamponu (PBS) içinde çözündürülerek hazırlandı ve 1 kısım MTT stok çözeltisi 9 kısım medium ile karıştırılarak MTT çalışma solüsyonu hazırlandı).
- Her bir göze 100 µL DMSO ilave edildi. Plakalar 5 dk hafifçe çalkalandıktan sonra ELISA' da 540 nm' de okundu.

iii) BrdU Testi [60, 65]

- a) Bölüm 3.2.2.3. açıklandığı gibi hazırlanan HeLa, LNCaP ve NIH3T3 hücre kültürlerinin üst kısmı tabana yapışmayan hücrelerin atılması için ters çevrilerek döküldü.
- b) Hücre kültür plakasının gözlerine sırasıyla likopen (besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan 1.28 μM -3.2 μM -8 μM -20 μM ve 50 μM ve dozlarda), β -karoten (besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan 1.28 μM -3.2 μM -8 μM -20 μM ve 50 μM ve dozlarda), THF (likopenin çözücüsü, 1 ml' de 1 μl olacak şekilde), DMSO (β -karoten' in çözücüsü, 1 ml' de 1 μl olacak şekilde) ilave edildi.
- c) 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra hücre kültür plakasının üst kısmı atılmadan her bir göze 100 μL BrdU labelling çözeltisi (BrdU labelling 1000X' ten 10 μL alınıp 1 ml medyum ilave edilerek seyreltme yapıldı) ilave edildi.
- d) 3 saat 37 $^{\circ}\text{C}$ ' de plaka bekletildikten sonra üst kısım ters çevrilerek döküldü. Plakaya absorban kağıt yerleştirilerek 2-8 $^{\circ}\text{C}$ ' de kurumaya bırakıldı.
- e) Plaka kurduktan sonra her bir göze 200 μL Fix Denat çözeltisi ilave edilerek 30 dk oda ısısında bekletildi.
- f) Fix Denat atıldıktan sonra 100 μL BrdU- POD çalışma çözeltisi kültür plakasının gözlerine ilave edilerek 90 dk oda ısısında bekletildi.
- g) BrdU-POD çalışma çözeltisi plaka ters çevrilip döküldükten sonra 200 μL yıkama çözeltisi ile plaka 3 kez yıkandı.
- h) Yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı ve her bir göze 100 μL substrat çözeltisi ilave edilerek 5 - 30 dk oda ısısında bekletildi.
- i) Süre sonunda plakanın her bir gözüne 25 μL 1 M H_2SO_4 çözeltisi ilave edilip hafifçe çalkalanarak ELISA' da 450 nm' de okundu.

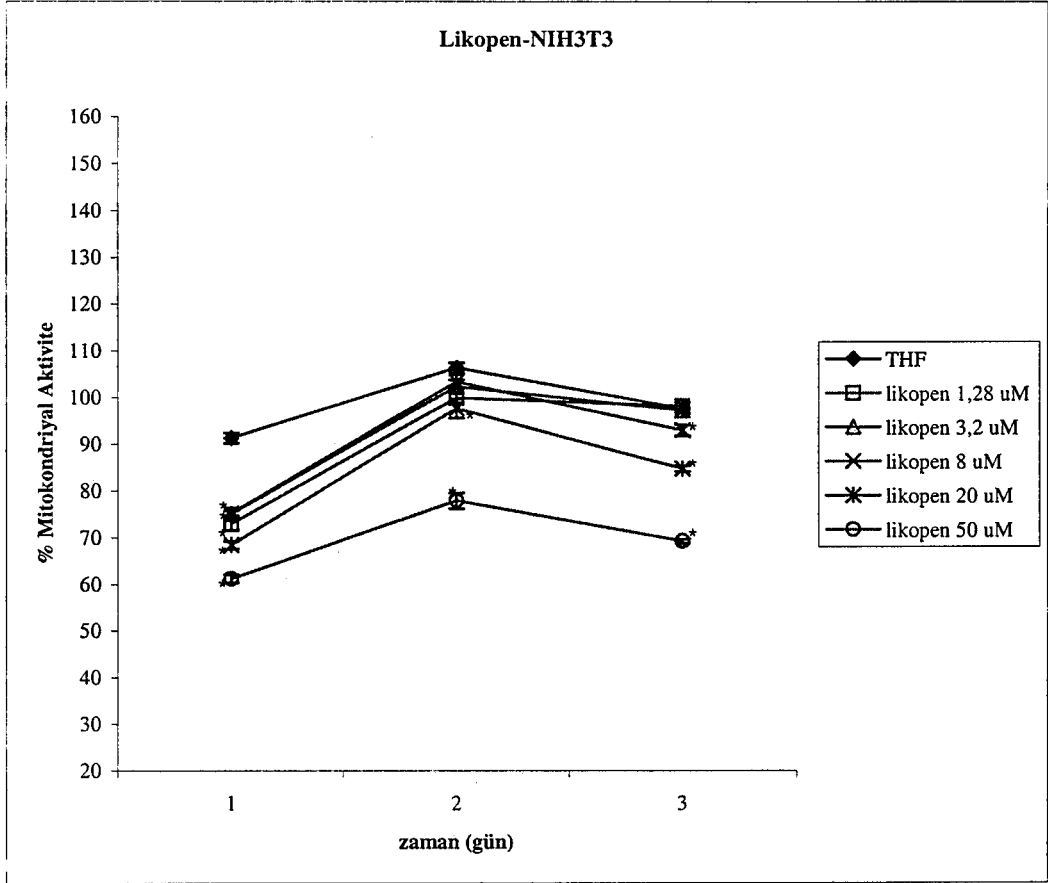
3.2.3. İstatiksel Değerlendirmeler

İstatiksel değerlendirmeler için SPSS programı kullanıldı. Elde edilen veriler hücreleri günler parametrelerine göre değerlendirildi ve çok yönlü ANOVA ile post-hoc olarak da Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlendi. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ kabul edildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Likopen Sonuçları

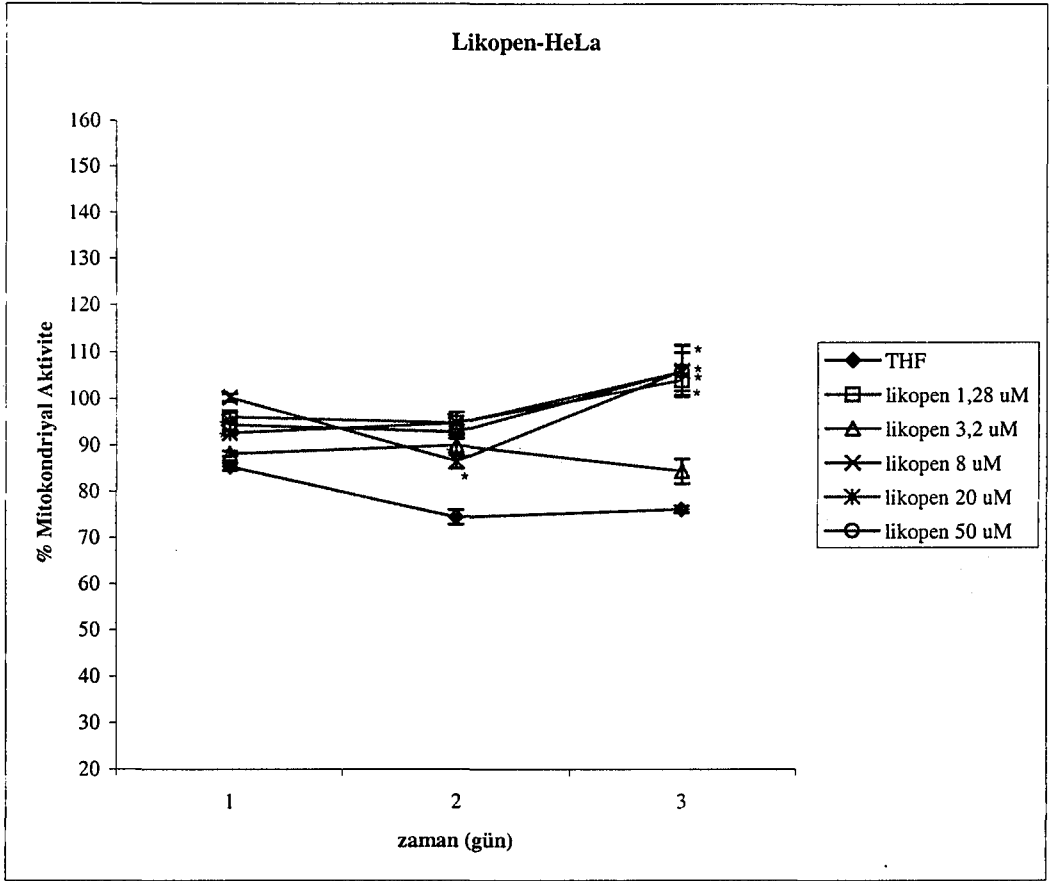
4.1.1. Likopenin MTT Ölçüm Sonuçları



Şekil 3. Likopenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

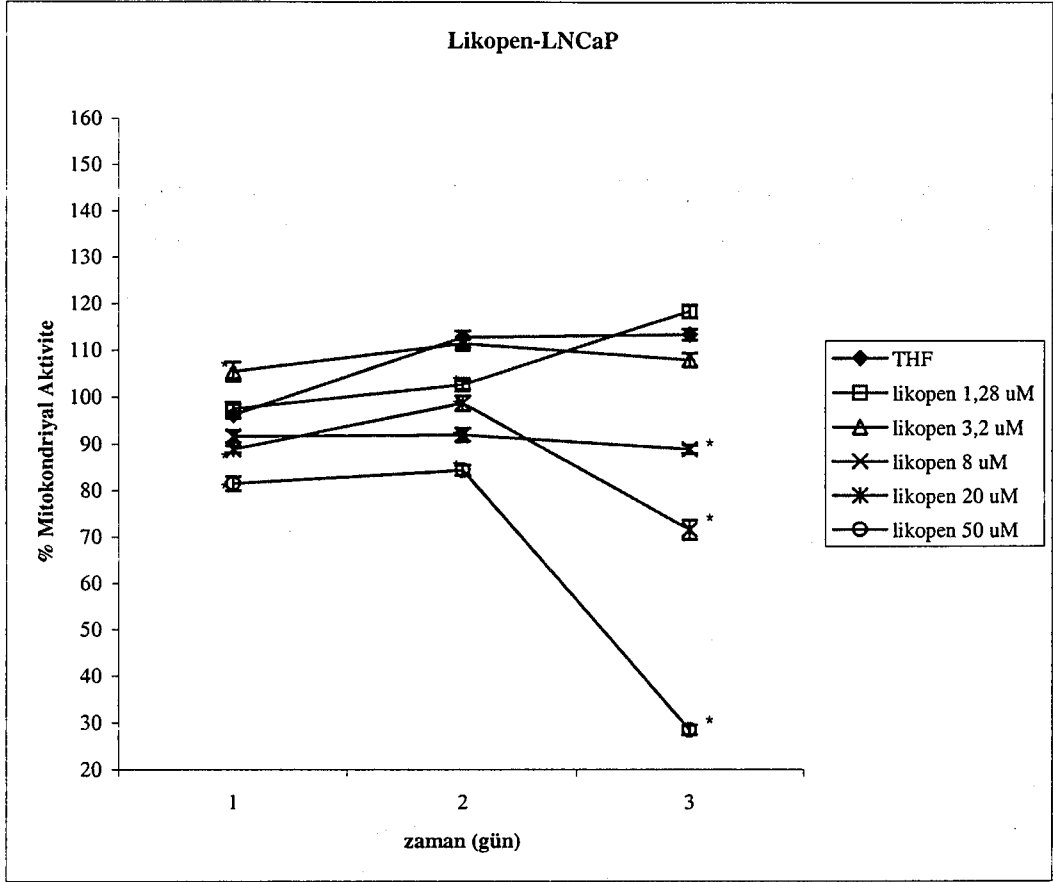
MTT sonuçlarına göre likopen, NIH3T3 hücrelerindeki mitokondriyal aktiviteyi THF' na göre doza bağımlı olarak azaltmıştır. 1. gün mitokondriyal aktivitedeki düşüş 50 μ M dozda maksimuma ulaşmaktadır. 2. gündeki tüm dozların değerlerindeki artışa rağmen THF' na göre yine tüm dozlar mitokondriyal aktiviteyi azaltmaktadır. Bütün günlerde 1,28-3,2-8 μ M dozların etkilerinin

birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir. 3. gün 1,28-3,2-8 μM dozlar THF'yle paralellik göstermektedir. Likopenin NIH3T3 hücreleri üzerine maksimum etkisi 1. günde tespit edilmiştir.



Şekil 4. Likopenin HeLa hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

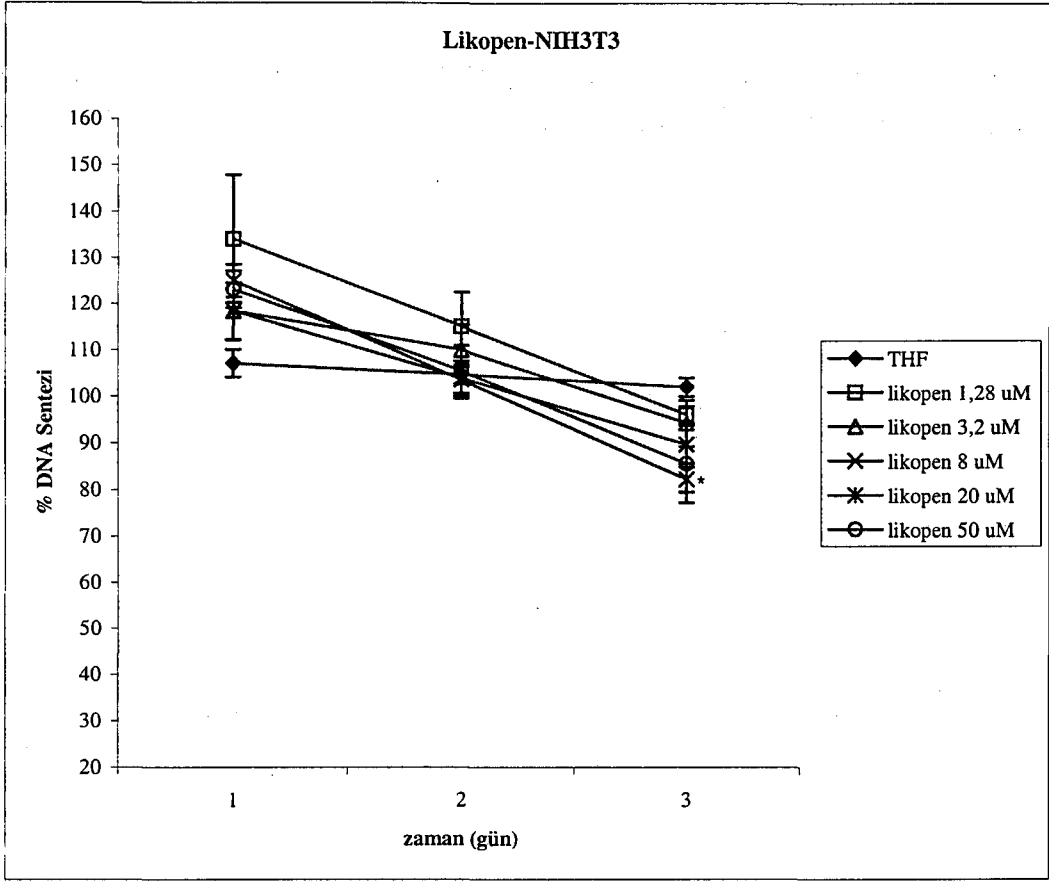
Likopen HeLa hücresi MTT sonuçları incelendiğinde 1. gün tüm dozlar THF' na göre az olsa da mitokondriyal aktiviteyi birbirine yakın değerlerde (% 86-94) arttırmaktadır. 2. gün tüm dozlar 1. güne yakın değerlerde ve 3. gün 3,2 μM doz hariç diğer dozlar 1. güne göre daha yüksek değerlerde mitokondriyal aktiviteyi arttırmışlardır.



Şekil 5. Likopenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

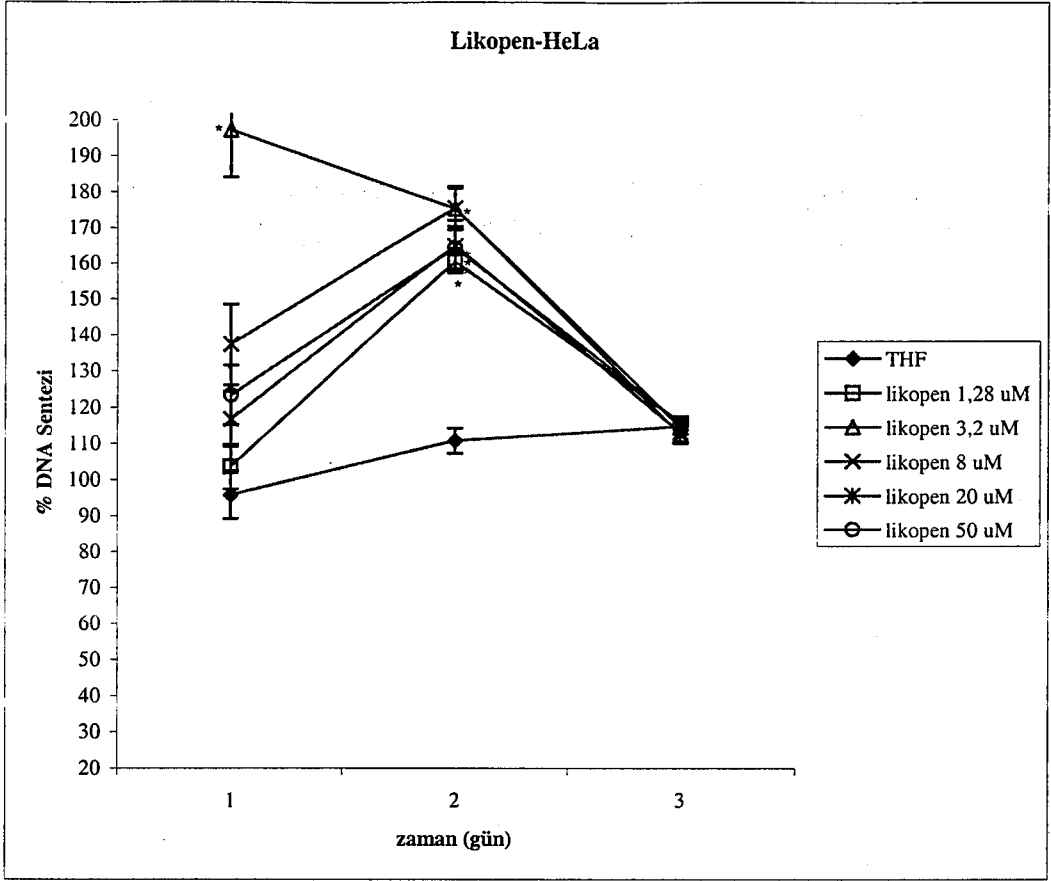
Likopen LNCaP hücresi MTT sonuçlarına göre, 1,28 μ M doz 1. gün THF'yle aynı değerdeyken 2. gün LNCaP hücrelerinde mitokondriyal aktivitenin azalmasına neden olmaktadır. Bu dozun etkisi 3. gün ortadan kalkmıştır. 3,2 μ M doz 1. gün mitokondriyal aktiviteyi stimüle etmekte, 2. ve 3. günler THF'yle paralel etki göstermektedir. 8 μ M doz 1., 2. ve 3. günlerde LNCaP hücrelerinde mitokondriyal aktiviteyi THF' na göre azaltmıştır. 20-50 μ M dozlar 1. gün mitokondriyal aktiviteyi azaltmaktadır. 2. gün 1. güne göre bu etki hafif azalsa bile mitokondriyal aktivitenin 3. gün önemli şekilde azalmasına neden olmuşlardır.

4.1.2. Likopenin BrdU Testi Ölçüm Sonuçları



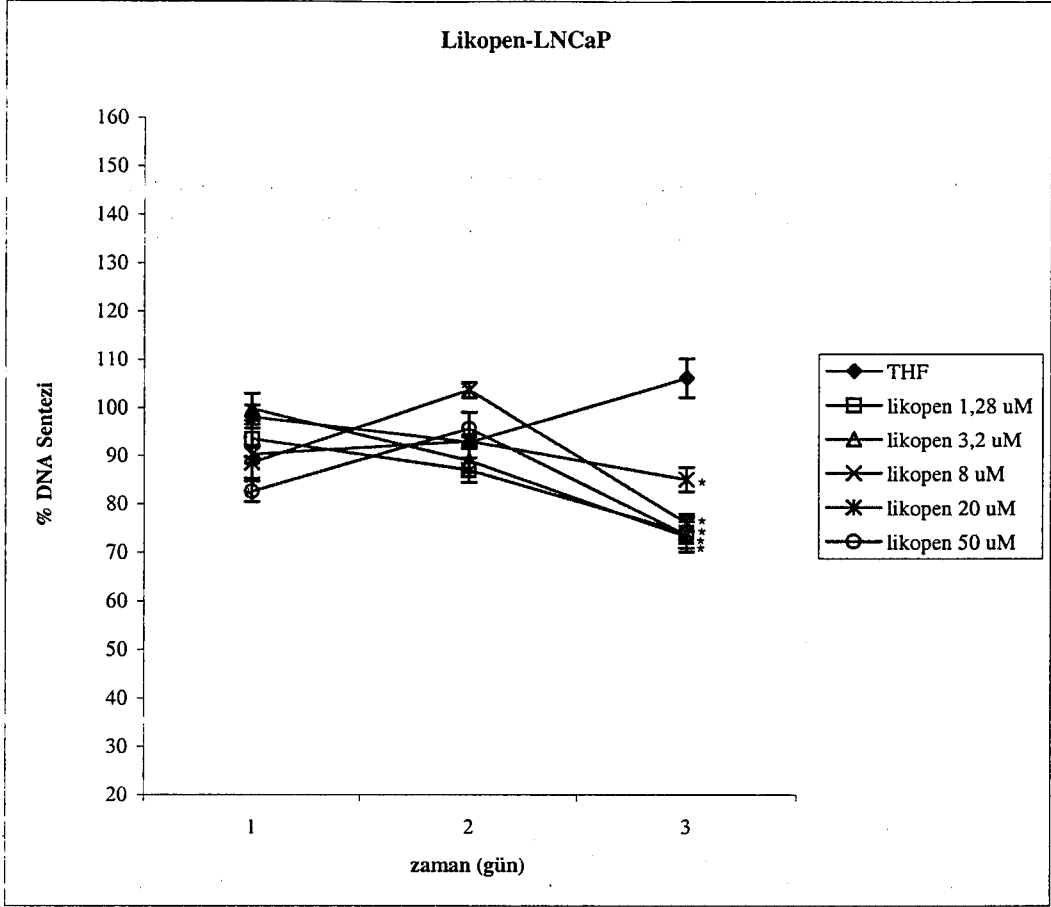
Şekil 6. Likopenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St.hata (n=5)

BrdU hücre proliferasyon testine göre likopen NIH3T3 hücrelerinde 1. gün dozla ters orantılı olarak DNA sentezini arttırmaktadır. 2. gün özellikle 1,28-3,2 μ M dozlarda 1. günden daha az etki gözlenmektedir. Diğer dozlar 2. gün THF'yle yaklaşık aynı değerlere sahip olmakla birlikte, 3. gün doza bağımlı olarak NIH3T3 hücrelerindeki DNA sentezinin azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 7. Likopenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

BrdU hücre proliferasyon testi sonuçları incelendiğinde 1. gün tüm dozlar THF' na göre hücrelerdeki DNA sentezi arttırmaktadır. Bu artış 3,2 μ M dozda maksimum değere (% 200) ulaşmıştır. 2. gün 3,2 μ M doz hariç diğer tüm dozlar DNA sentezinde 1. güne göre daha fazla artışa neden olmaktadır. 2. günde tüm doz değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. 3. gün dozlardaki etki kaybolmakta THF' yle paralellik göstermektedir.

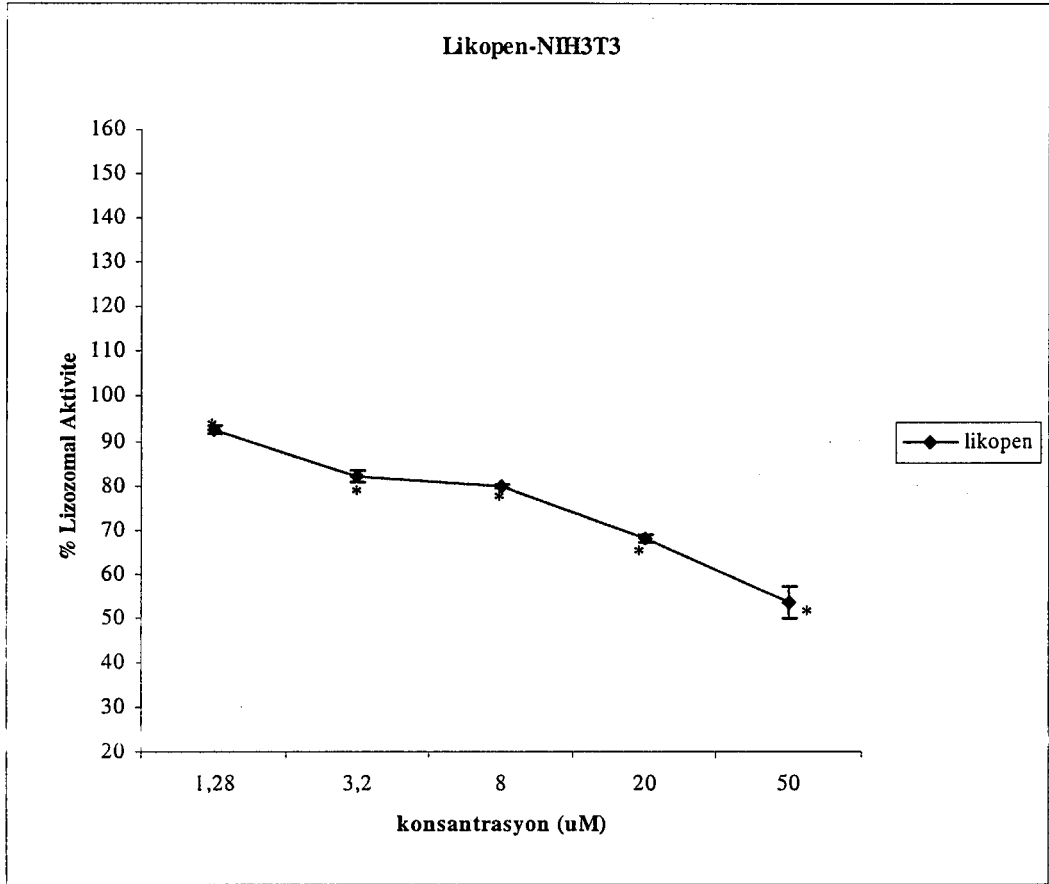


Şekil 8. Likopenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

BrdU hücre proliferasyon testine göre, likopen 1,28 μ M dozda DNA sentezini 1. gün 3,2 μ M' dan daha etkili olarak azaltmakta, 2. gün 3,2 μ M doz ile aynı değerde, 3. günde ise 3,2-20-50 μ M dozlar ile yaklaşık aynı değerlerde (%73-76) DNA sentezini azaltmaktadır. 3,2 μ M doz 1. gün THF'yle paralel değerde, 2. ve 3. günlerde DNA sentezini azaltırken bu dozun maksimum etkisi 3. gün gözlenmiştir. 8 μ M doz 1. gün 20 μ M doz ile aynı değerde (% 74) LNCaP hücrelerinde DNA sentezini azaltırken, 2. gün THF'yle paralel değerde, 3. gün diğer dozlara oranla DNA sentezini daha az azaltmaktadır. 20 μ M doz 1.gün 8 μ M dozla aynı, 2. gün LNCaP hücrelerindeki DNA sentezini maksimum arttıran doz olmakla birlikte, 3. gün 1,28-3,2-50 μ M dozlara yakın bir değerle hücrelerdeki

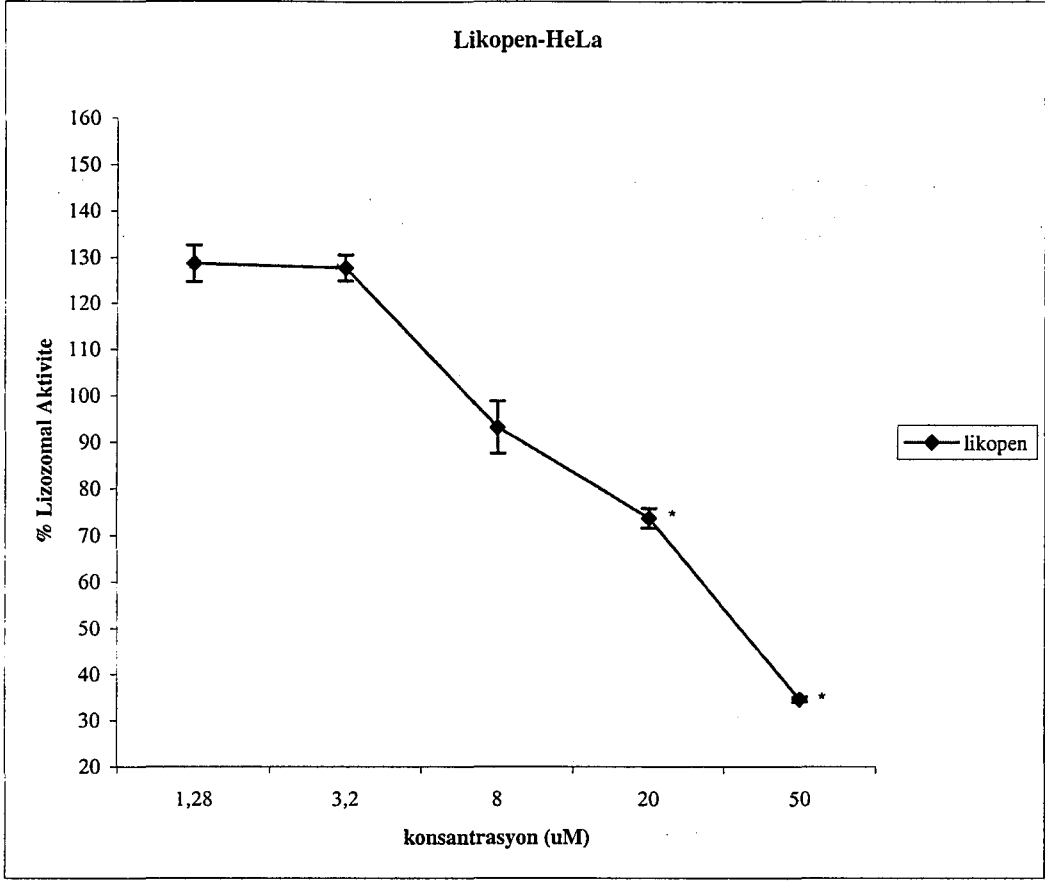
DNA sentezinin azalmasına neden olmaktadır. 50 μ M doz 1. gün maksimum değerde DNA sentezinin azaltmıştır. 2. gün ise DNA sentezinin hafif artmasına neden olurken 3. gün 1,28-3,2-20 μ M dozlarla birbirine yakın değerlerde LNCaP hücrelerindeki DNA sentezini azalmasına neden olmuştur.

4.1.3. Likopenin TNF Sonuçları



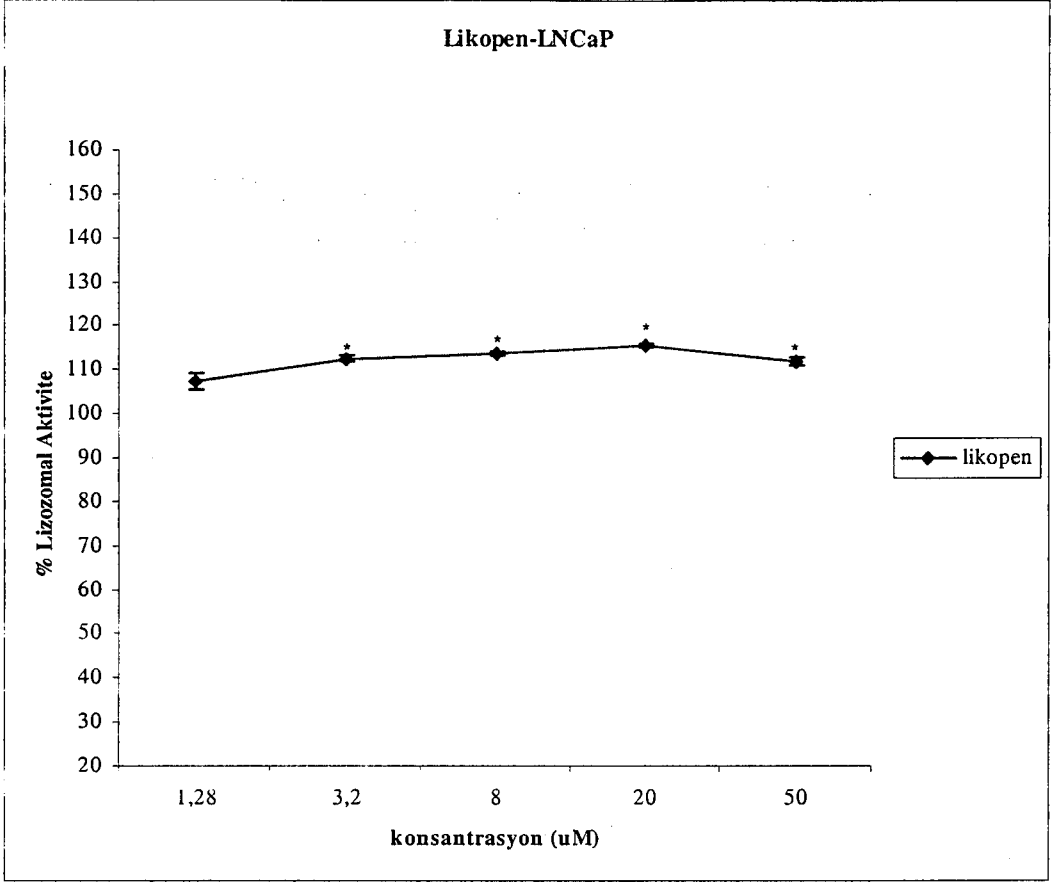
şekil 9. Likopenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

Likopen TNF üzerinden doza bağımlı olarak NIH3T3 hücrelerindeki lizozomal aktiviteyi azaltmaktadır.



Şekil 10. Likopenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

1,28-3,2 μ M dozlar THF' na göre HeLa hücrelerinde lizozomal aktivitede artışa neden olurken, 8-20-50 μ M dozlar TNF üzerinden lizozomal aktivitenin azalmasına neden olmaktadır.

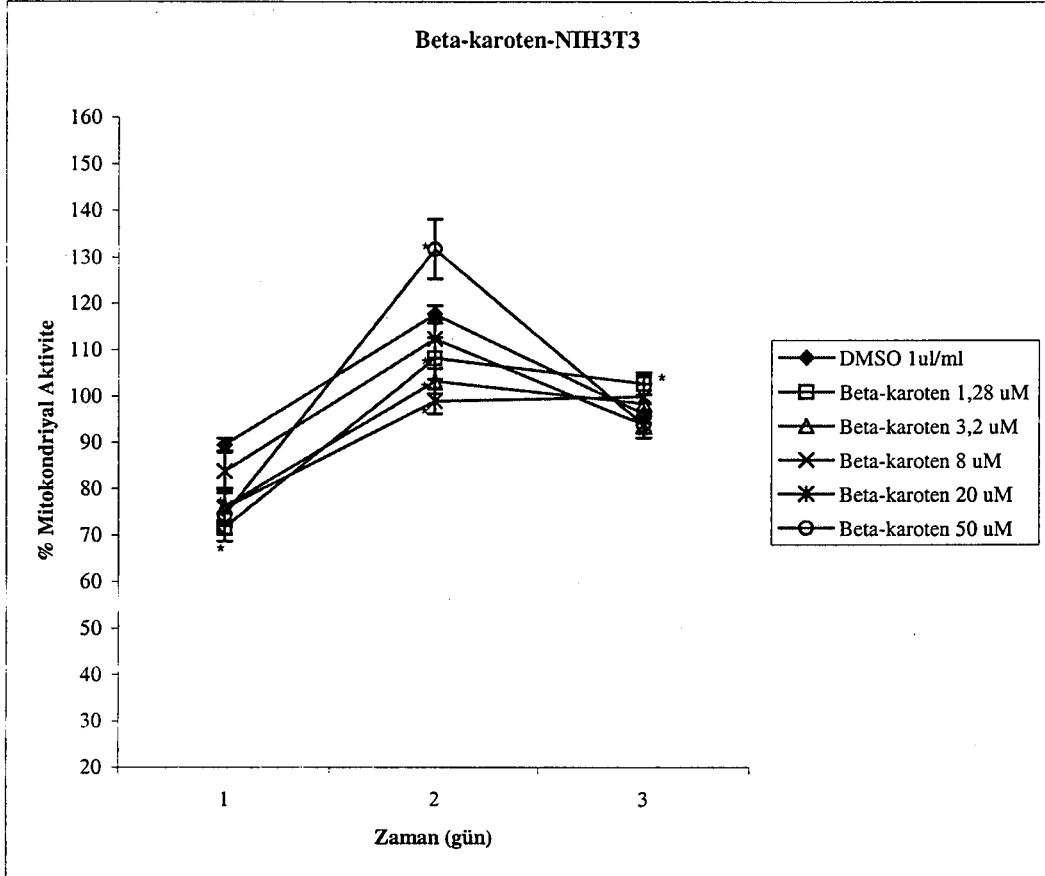


Şekil 11. Likopenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ile değerlendirilmeleri. (*) THF'ye göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

LNCaP hücreleri üzerine likopenin TNF üzerinden hiçbir etkisi gözlenememektedir.

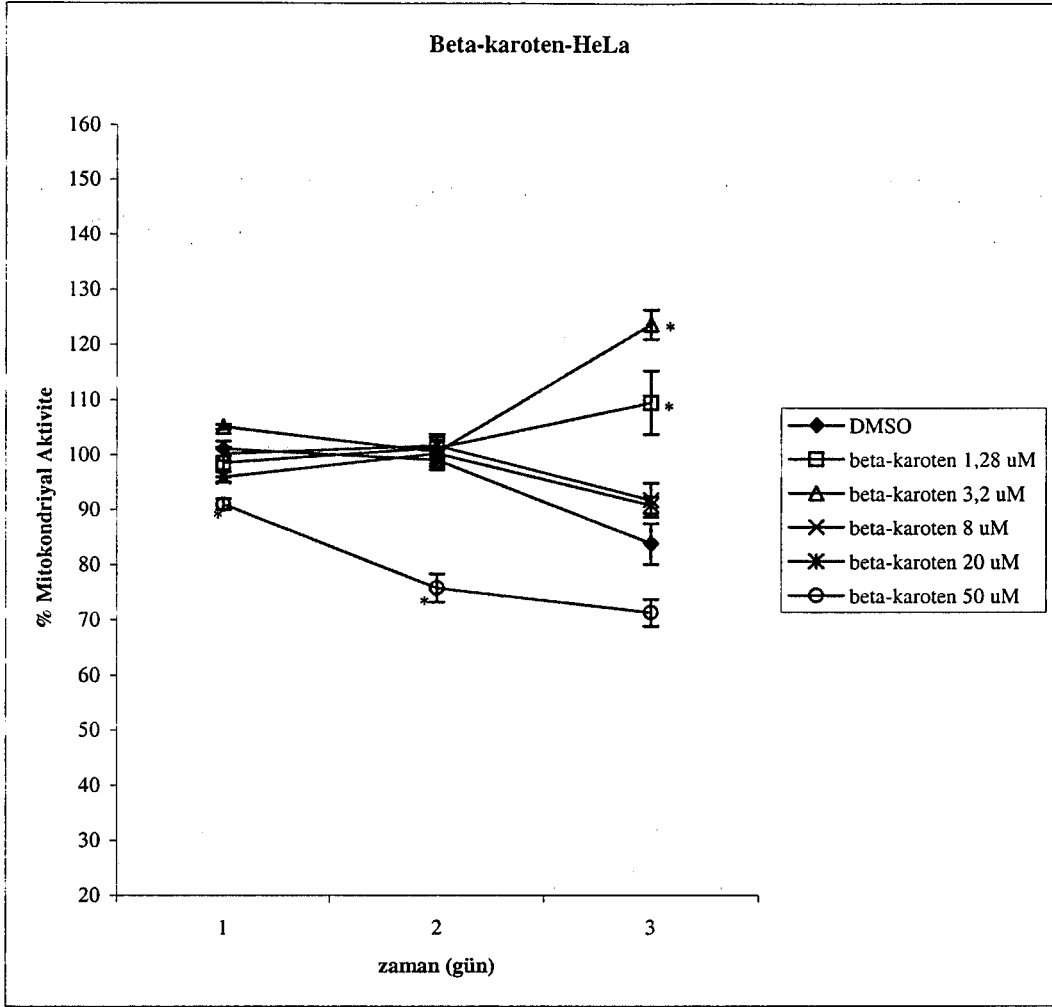
4.2. β -karoten Sonuçları

4.2.1. β -karoten MTT Ölçüm Sonuçları



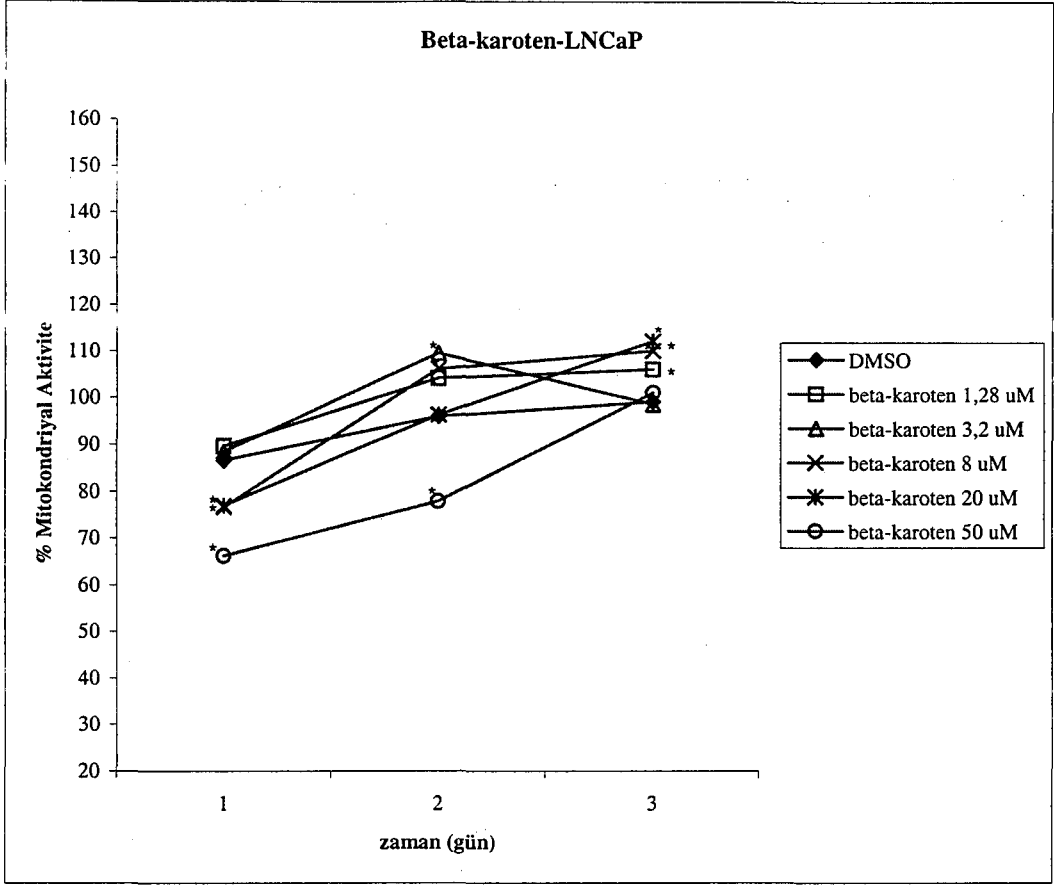
Şekil 12. β -karotenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

MTT sonuçlarına göre β -karotenin tüm dozları 1. gün DMSO'ya oranla mitokondriyal aktiviteyi azaltmaktadır. 2. gün sadece 50 μ M doz DMSO'ya göre mitokondriyal aktiviteyi arttırmaktadır. 3. gün 20-50 μ M dozlar mitokondriyal aktiviteyi hafifçe azaltırken 1,28-3,2-8 μ M dozlar NIH3T3 hücrelerinde mitokondriyal aktiviteyi yine hafif olarak arttırmışlardır.



Şekil 13. β -karotenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

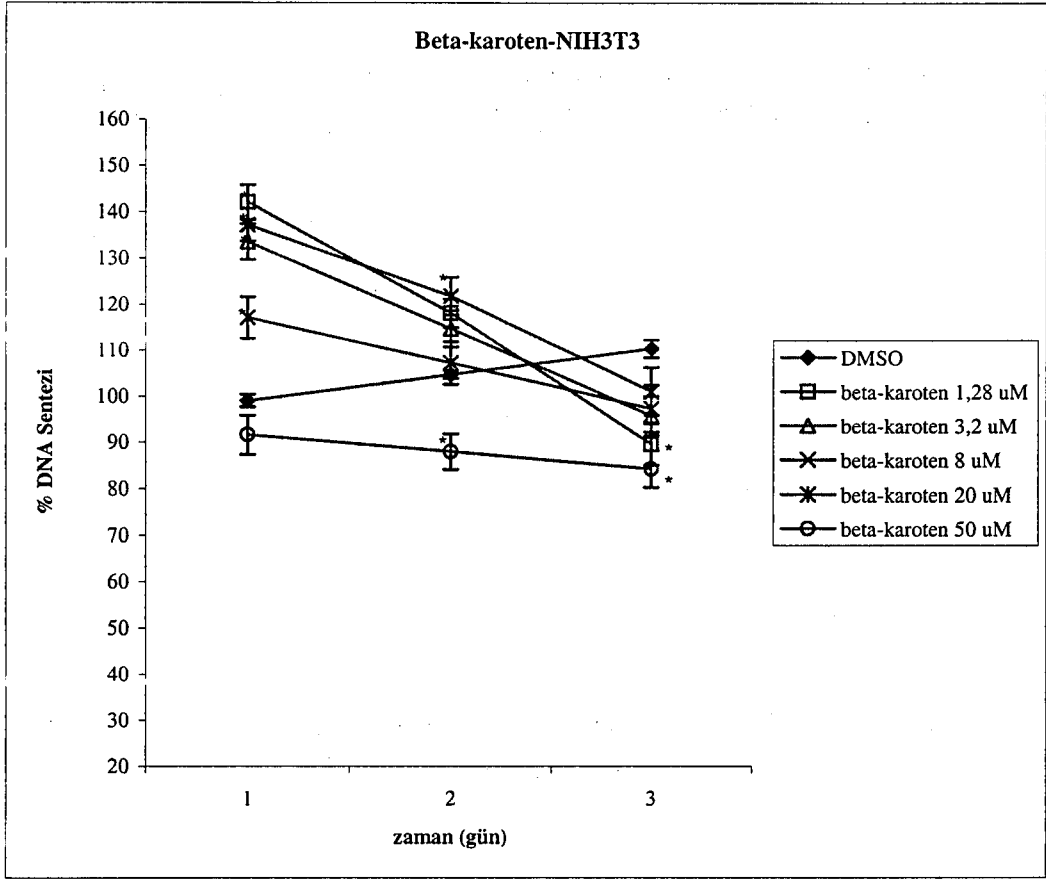
β -karoten MTT sonuçlarına göre 1. ve 2. günlerde 50 μ M hariç diğer tüm dozlarda HeLa hücrelerindeki mitokondriyal aktiviteyi fazla etkilememektedir. 50 μ M doz β -karoten, 1., 2. ve 3. günlerde DMSO'ya göre mitokondriyal aktiviteyi azaltmıştır. 3. gün 1,28-3,2-8-20 μ M dozların mitokondriyal aktiviteyi azalttığı gözlenmektedir.



Şekil 14. β -karotenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

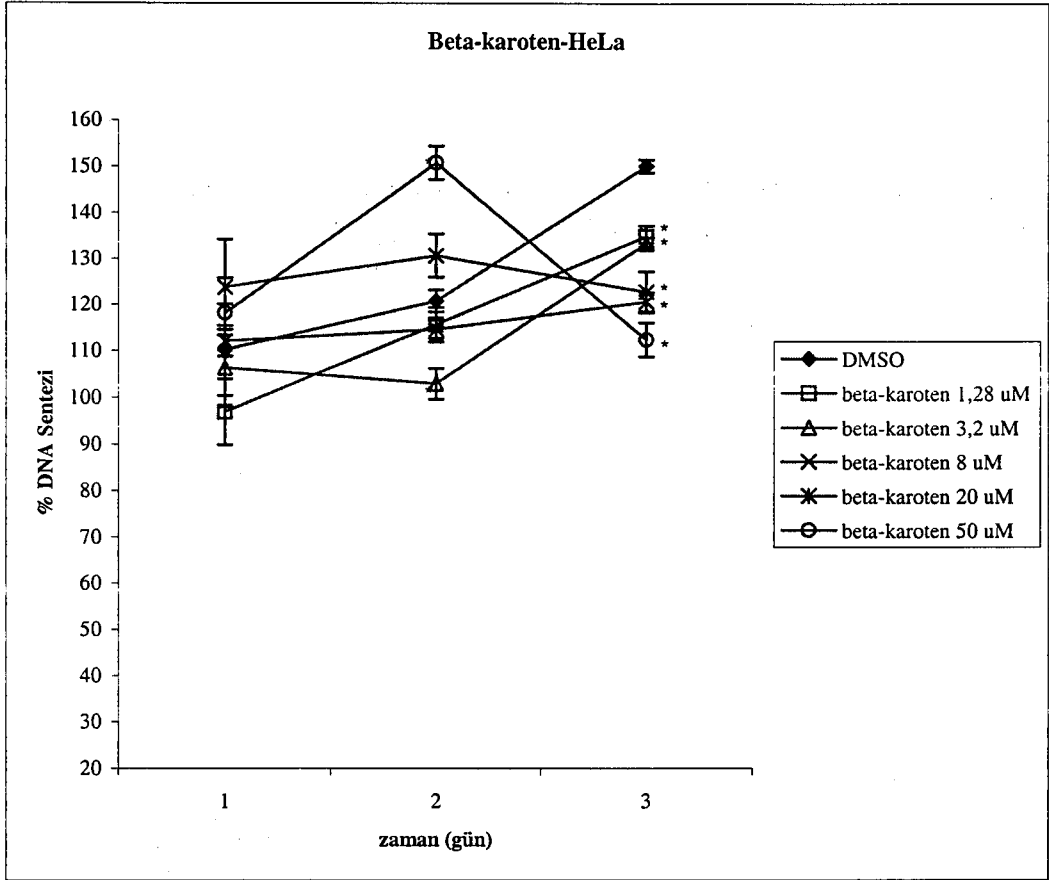
Elde edilen LNCaP hücresi MTT verilerine göre β -karotenin 1,28-3,2 μ M dozları DMSO'ya göre 1. ve 2. günlerde mitokondriyal aktiviteyi artırırken, 3. günde 1,28 μ M doz 2. güne paralel, 3,2 μ M dozda DMSO ile paralel bir sonuç göstermektedir. 8 μ M doz 1. gün mitokondriyal aktiviteyi azaltmakta, 2. gün % 106, 3. gün ise % 110 kadar mitokondriyal aktiviteyi arttırmaktadır. 20 μ M doz mitokondriyal aktiviteyi 1. gün azaltmakta (% 77), 2. gün DMSO ile paralel bir sonuç vermekte ve 3. gün % 112 oranında arttırmaktadır. 50 μ M doz 1. gün mitokondriyal aktiviteyi azaltmış, 2. ve 3. günlerde bu etki ortadan kalkmış ve 3. gün DMSO ile paralellik göstermiştir.

4.2.2. β -karoten BrdU Ölçüm Sonuçları



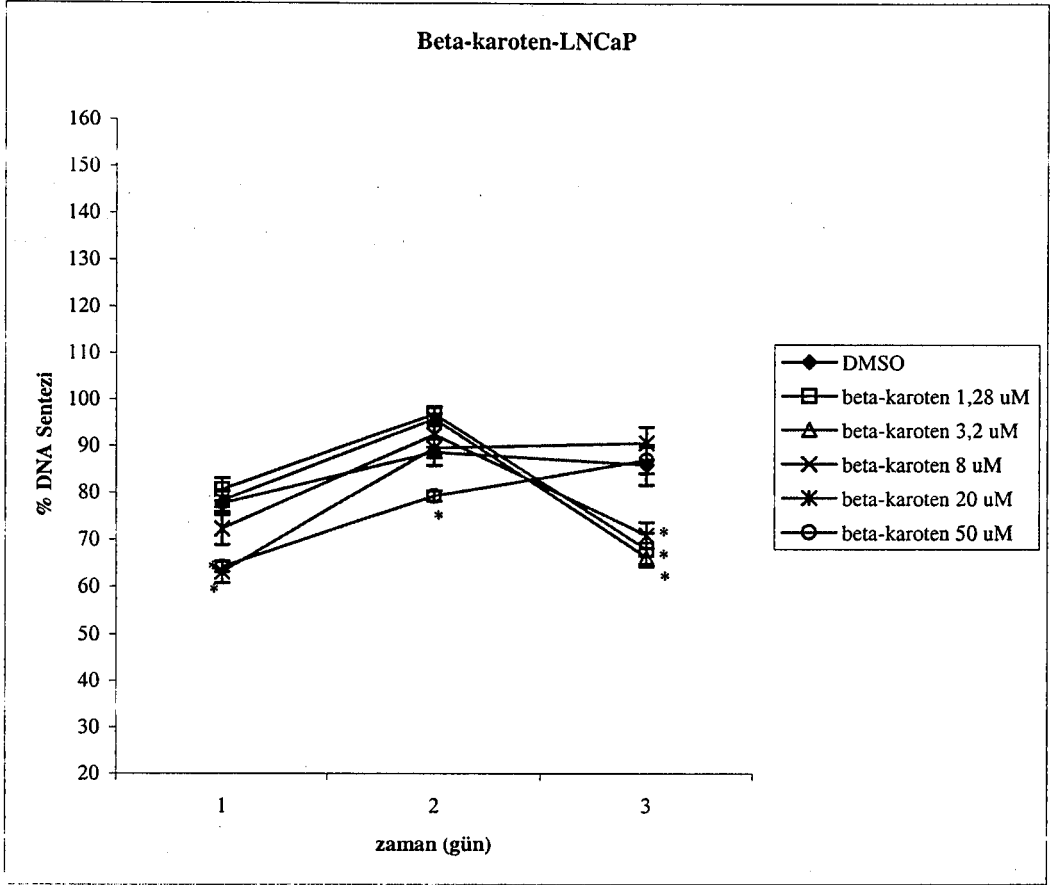
Şekil 15. β -karotenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

BrdU hücre proliferasyon testine göre β -karotenin 1,28-3,2-8-20 μ M dozları 1. gün DNA sentezini arttırırken sadece 50 μ M doz NIH3T3 hücrelerindeki DNA sentezini azaltmaktadır. 2. gün 50 μ M doz hariç diğer tüm dozlar 1. güne göre daha az ama DMSO'ya göre hücrelerdeki DNA sentezini arttırmaktadır. 3. gün tüm dozlarda DNA sentezi DMSO'ya göre azalmıştır.



Şekil 16. β -karotenin HeLa hücreleri üzerindeki etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

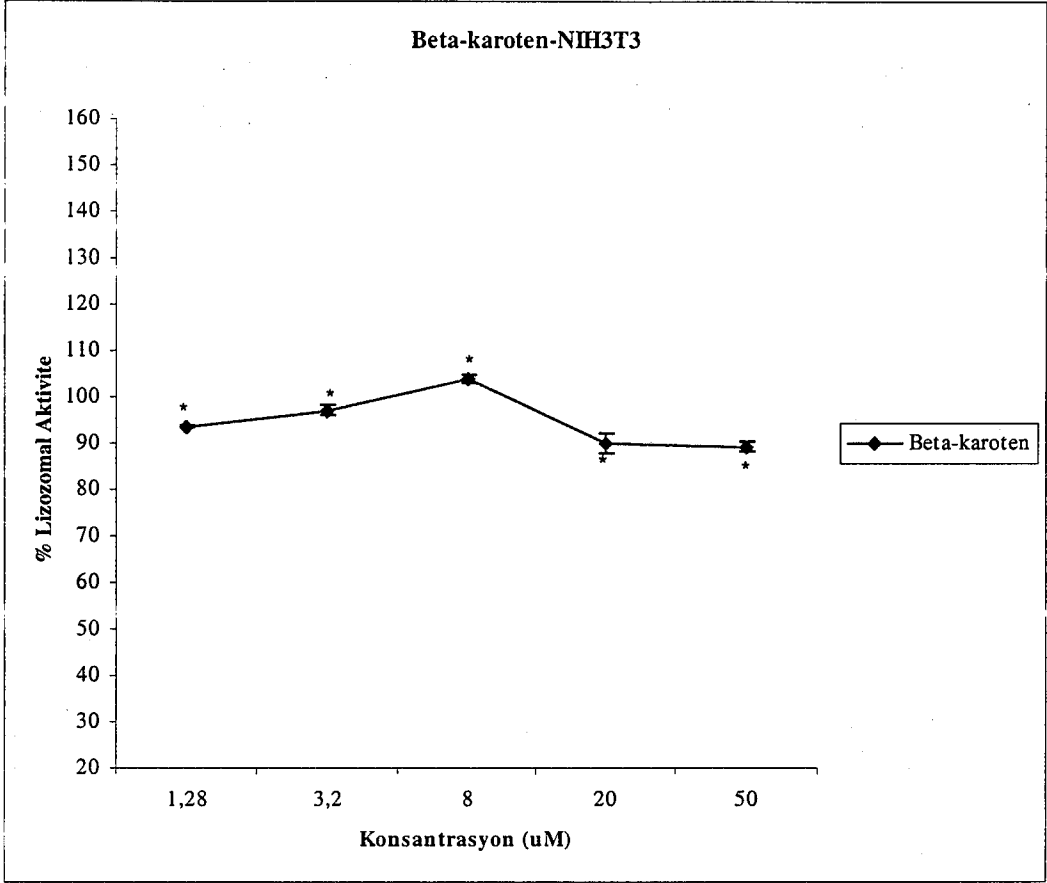
BrdU hücre proliferasyon testinde, 1,28-3,2 μ M dozlar 1., 2. ve 3. günlerde DMSO'ya göre DNA sentezini azaltmaktadır. 8 μ M doz 1. gün DMSO'yla paralel bir değer gösterirken 2. ve 3. günlerde DNA sentezini azaltmıştır. 20 ve 50 μ M dozlar 1. ve 2. günlerde DNA sentezini artırırken 3. gün HeLa hücrelerindeki DNA sentezini azaltmaktadır. 50 μ M dozla 2. gün maksimum stimülasyon 3. gün maksimum inhibisyon gözlenmiştir.



Şekil 17. β -karotenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin BrdU hücre proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

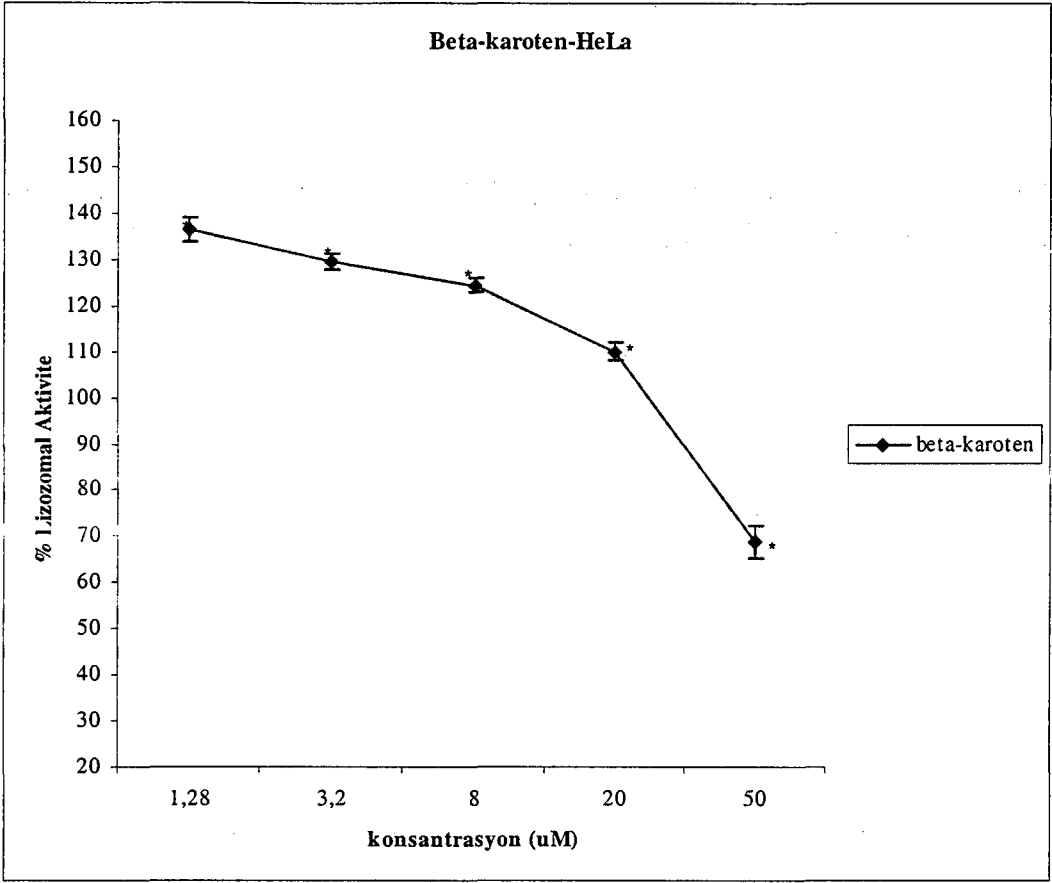
BrdU hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre LNCaP hücrelerinde β -karotenin 1,28-3,2 μ M dozları DMSO'ya göre 1. ve 2. günlerde DNA sentezini arttırmaktadır ve bu etki 3. gün kaybolmaktadır. 8 μ M doz 1. ve 2 günlerde DNA sentezini arttırmış, 3. gün ise 1,28-3,2 μ M dozlarla yakın değerlerde DNA sentezini azaltmıştır. 20 μ M doz 1. gün DNA sentezini azaltmakta, 2. ve 3. günlerde bu dozun etkisi kaybolmaktadır. 50 μ M doz 1. ve 2. günlerde DNA sentezini azaltırken 3. gün bu etki ortadan kalkmıştır.

4.2.3. β -karoten TNF Sonuçları



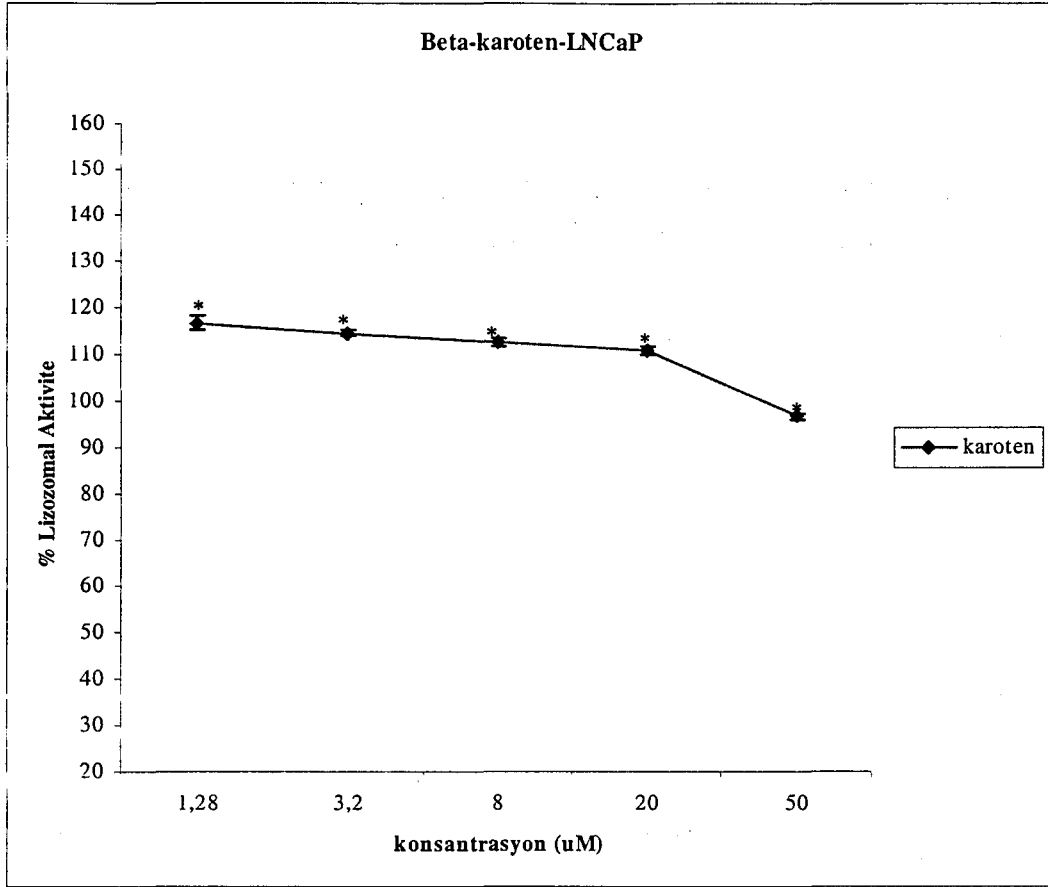
Şekil 18. β -karotenin NIH3T3 hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

β -karoten, NIH3T3 hücrelerinde TNF üzerinden lizozomal aktiviteyi etkilememektedir.



Şekil 19. β -karotenin HeLa hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

Doza bağımlı olarak β -karoten, TNF üzerinden lizozomal aktiviteyi azaltmaktadır.



Şekil 20. β -karotenin LNCaP hücreleri üzerinde etkilerinin TNF testi ile değerlendirilmeleri. (*) DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. hata (n=5)

β -karoten LNCaP hücrelerindeki lizozomal aktiviteyi hafif arttırmasına rağmen dozlar arasında önemli farklılıklar olmaması sebebiyle etkisini TNF üzerinden göstermediği düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Likopenin NIH3T3 hücrelerinde, mitokondriyal aktiviteyi doza bağımlı olarak azalttığı görülmektedir. İlk gün gözlenen maksimum etki likopenin antioksidan aktivitesi ile ilgili olabilir [21]. Hücreler mitozda iken mitokondriyal aktiviteleri azaldığı gözlenmiştir. BrdU işaretlemesi ve MTT testi ile elde edilen sonuçlar DNA sentezindeki artış ve mitokondriyal aktivitenin azalması arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir. 1. gün meydana gelen DNA sentezindeki artış sonucu, kuyucuktaki hücrelerin aşırı çoğalarak yüzeyi tamamen kaplaması ve ortamdaki besiyerinin yetersiz kalması 2. ve 3. günlerde gözlenen DNA sentezindeki azalmanın nedenleri olabilir (Şekil 6). TNF testinden elde edilen sonuçlara göre, likopen, makrofajlardan TNF salınımını stimüle etmekte ve açığa çıkan TNF, NIH3T3 hücreleri üzerinde doza bağımlı olarak lizozomal aktiviteyi azaltmaktadır (Şekil 9). Buna göre koşullar düşünüldüğünde likopenin fibroblast hücreleri üzerinde neden olabileceği proliferatif etkinin, yine çalışmalarımızda elde edilen veriler doğrultusunda likopen tarafından indüklenen TNF'in antiproliferatif etkisi ile kompanse edilebileceği düşünülmektedir. Bütün bu deneylerin sonuçları doğrultusunda, likopenin NIH3T3 hücreleri üzerinde önemli sayılabilecek bir sitotoksik etkisinin söz konusu olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

β -karoten uygulanması ile NIH3T3 hücrelerinde 1. gün mitokondriyal aktivitenin azalması ile DNA sentezinin artması, likopenin bu hücreler üzerindeki etkisiyle paralellik göstermektedir. Bu sonuçla da hücrelerin mitozda iken mitokondriyal aktivitelerinin azaldığı genel sonucuna varılabilir. 2. günde 50 μ M dozda β -karotenin DNA sentezini inhibe ettiği ve antiproliferatif etkiye neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 15). Diğer yandan 2. günde aynı dozda β -karoten ile bu hücrelerde mitokondriyal aktivitenin artması, bu doz ile ortaya çıkan toksik etkinin hücreler tarafından kompanse edilmeye çalışıldığının bir göstergesidir (Şekil 12). β -karoten NIH3T3 hücreleri üzerinde TNF'e bağımlı bir aktivite göstermemektedir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, TNF sonuçları hariç, NIH3T3 hücrelerinde β -karoten ile likopen benzer etki profili göstermektedir.

β -karoten de mitokondriyal aktiviteyi azaltırken DNA sentezini arttırdığı için, NIH3T3 hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etkisinin olmadığı düşünülmektedir.

Likopenin çözücüsü olan THF'nın, HeLa hücrelerinde mitokondriyal aktiviteyi inhibe ederken, NIH3T3 ve LNCaP hücrelerinde mitokondriyal aktiviteyi etkilemediği gözlenmiştir. Likopen HeLa hücrelerinde mitokondriyal aktiviteyi THF'na oranla arttırmakta ancak bu değer yine de kontrol seviyesine ulaşmamaktadır. Likopen THF'da çözüldüğü için likopen ile birlikte hücreye THF'da verilmiş olmaktadır. Hücrelerde likopenin etkisiyle THF'nın sitotoksik etkisi engellenmektedir. Likopenin HeLa hücreleri üzerindeki etkisinin doza bağımlı olmayışı maddenin modülatör özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. Likopenin HeLa hücrelerinde 1. ve 2. günlerde DNA sentezini % 200'e kadar arttırması östrojen reseptörü (+) olan bu hücrelerde maddenin proliferatif etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 7). Likopen HeLa hücrelerinde TNF üzerinden lizozomal aktiviteyi doza bağımlı olarak azaltmaktadır (Şekil 10). MTT, BrdU ve TNF testlerinden elde edilen sonuçların tümü birlikte değerlendirildiğinde, likopenin HeLa hücreleri üzerinde proliferatif etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

β -karotenin HeLa hücreleri üzerine 50 μ M dozu mitokondriyal aktiviteyi belirgin şekilde azaltırken DNA sentezini arttırmaktadır (Şekil 13-16). 3. günde DNA sentezi maksimuma ulaştığı için kuyucuktaki hücrelerin yüzeyi tamamen kaplaması ve ortamdaki besiyerinin yetersizliği sebebiyle DNA sentezinin azaldığı gözlenmektedir (Şekil 16). 50 μ m doz β -karoten HeLa hücrelerinde proliferasyonu stimüle etmektedir. Diğer dozların HeLa hücrelerinde belirgin bir etkisi gözlenmemektedir. β -karoten HeLa hücrelerinde TNF üzerinden lizozomal aktiviteyi doza bağımlı olarak azaltmaktadır (Şekil 19). Tüm grafik incelendiğinde β -karotenin makrofajlardan TNF salınımı için zayıf bir stimülatör olduğu sonucunu verilmektedir.

LNCaP hücrelerinde likopen 3,2 μ M dozda mitokondriyal aktiviteyi THF'ye ve kontrole göre hafif arttırmaktadır (Şekil 5). Likopenin diğer dozlarından farklı olarak gözlenen bu etkiye benzer etkiler karotenoidlerle yapılan başka çalışmalarda da gözlenmektedir [66]. 2. günden itibaren düşük dozda etki ortadan kalkmakla beraber doz yükseldikçe etkinin şiddeti ve süresi artmaktadır. 2. günden itibaren uygulanan dozlarda net fakat birbirine çok yakın antiproliferatif

etki gözlenmektedir. 3. günde DNA sentezindeki azalma yaklaşık % 73' e kadar düşmektedir (Şekil 8). Ancak deney 4. ve 5. günlerde devam ettirilerek bu etkinin sürekliliğine bakılabilir. LNCaP hücrelerinde likopen ile yapılan MTT ve BrdU hücre proliferasyon testlerinde elde edilen veriler doğrultusunda, likopenin östrojen reseptörü (+) prostat kanseri üzerine antiproliferatif dolayısıyla antikanser etkisi olduğu tespit edilmiştir. HeLa ile yapılan çalışmalarda serviks kanseri üzerine likopenin proliferatif etkisi göz önüne alındığında likopenin östrojenik çalışan bir fitoöstrojen olduğu söylenebilir. Bunun tam olarak aydınlatılması için östrojen reseptör sayımı, prostat spesifik antijen (PSA) testleri gibi daha spesifik çalışmaların HeLa ve LNCaP hücreleri üzerinde yapılması gerektiği kanısındayız. Likopenin PSA üretimini azalttığı klinik çalışmalarla gösterilmiş ve bununla birlikte tümör boyutunda küçülme gözlenmiştir [67]. Diğer hücrelerle yapılan çalışmalarda likopenin TNF salınımı üzerine etkisi olduğu saptansa da TNF üzerinden LNCaP hücrelerindeki lizozomal enzim aktivitesi üzerine belirgin bir etkisi gözlenmemektedir.

β -karoten ile LNCaP hücrelerinde yapılan MTT ve BrdU hücre proliferasyon testlerinden elde edilen verilere göre, 20-50 μ M dozlar 1. ve 2. günlerde hem mitokondriyal aktiviteyi hem de DNA sentezini azaltmaktadır (Şekil 14-17). Ancak 2. günden itibaren bu etkilerin ortadan kalktığı gözlenmiştir. Esas antiproliferatif etki β -karotenin 1,28-3,2-8 μ m dozlarında 3. gün görülmektedir (Şekil 17). Ancak bu etkiye zıt olarak 3. günde mitokondriyal aktivite artmaktadır (Şekil 14). Bu bulgulara dayanılarak β -karotenin sadece düşük dozlarda prostat kanseri üzerine antiproliferatif etkili olduğu sonucuna varılmaktadır. TNF üzerinden LNCaP hücrelerinde β -karotenin herhangi bir etkisine rastlanmamıştır. β -karotenin sadece yüksek dozlarında HeLa hücrelerinde TNF üzerinden etkisinin gözlenmesi, makrofajlardan TNF salınımını stimüle edici etkisinin düşük olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, likopenin ER (+) HeLa serviks adenokarsinoma hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği, ancak ER (+) olan LNCaP prostat kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkili olduğu ve bu etkinin likopenin östrojenik aktivitesinden kaynaklandığı kanaatine varılmıştır. β -karotenin ise böyle bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. RAO, A. V., AGARWAL, S., *Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review, Nutrition Research*, **19**, 305 - 323 (1999)
2. SHI, J., MAZZA, G., MAGUER, M., *Functional Food, Volume 2*, 136 – 152 (2002)
3. GIOVANNUCCI, E., *Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature, J Natl Cancer Inst*, **91**, 317 – 331 (1999)
4. TALWAR, D., HA, T., COONEY, J., BROWNLEE, C., JO' REILLY, D., *A routine method for the simultaneous measurement of retinal, α -tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC, Clinica Chimica Acta*, **270**, 85 – 100 (1998)
5. WEI, Y., ZHANG, T., XU, G., ITO, Y., *Application of analytical and preparative high- speed counter- current chromatography for separation of lycopene from crude extract tomato paste, Journal of Chromatography A*, **299**, 169 – 173 (2001)
6. KRIS-ETHERTON, P.M., HECKER, K.D., BONANOME, A., COVAL, S.M., BINKOSKI, A.E., HILPERT, K.F., GRIEL, A.E., ETHERTON, T.D., *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, The American Journal of Medicine*, **113**, 71 – 88 (2002)
7. MATOS, H.R., DI' MASCIO P., MEDEIROS, M.H.G., *Protective Effect of Lycopene on Lipid Peroxidation and Oxidative DNA Damage in Cell Culture Archives of Biochemistry and Biophysics*, **383**, 56 - 59 (2000)
8. GARRETT, D.A., FAILLA, M.L., SARAMA, R.J., *Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an digestion/Caco-2 cell culture model, The Journal of Nutritional Biochemistry*, **11**, 574 – 580 (2000)
9. PFITZNER, I., FRAN CZ, P.I., BIESALSKI, H.K., *Carotenoid:methyl- β cyclodextrin formulations: an improved method for supplementation of*

- cultured cells, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1474, 163 – 168 (2000)*
10. YEH, S.L., HU, M.L., *Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells, The Journal of Nutritional Biochemistry, 11, 548 – 554 (2000)*
 11. MARTIN, K.R., WU, D., MEYDANI, M., *The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells, Atherosclerosis, 150, 265-274 (2000)*
 12. RAHMAN, A., PARKER, R.S., *Carotenoid photodegradation products and proliferation of murine lymphoid cell lines, Nutrition Research, 21, 733 – 745, 2001*
 13. WILLIS, M.S., WIANS, F.H., *The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances, Clinica Chimica Acta, 330, 57 - 83 (2003)*
 14. OFFORD, E.A., GAUTIER, J.C., AVANTI, O., SCALETTA, C., RUNGE, F., KRÄMER, K., APPLGATE L.A., *Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnolic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts, Free Radical Biology and Medicine, 32, 1293 – 1303 (2002)*
 15. TONIOLO, P., VAN KAPPEL A.L., AKHMEDKHANOV, A., FERRARI, P., KATO, I., SHORE, R.E., RIBOLI, E., *Serum carotenoids and breast cancer, Am J Epidemiol, 153 (12), 1142 – 1147 (2001)*
 16. CARPENTER, K.L.H., HARDWICK, S.J., ALBARANI, V., MITCHINSON, M.J., *Carotenoids inhibits DNA synthesis in human aortic smooth muscle cells, FEBS Letters, 447, 17 – 20 (1999)*
 17. BOILEAU, T.W., CLINTON, S.K., ERDMAN, J.W., *Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats, J Nutr, 130(6), 1613 – 1618 (2000)*
 18. FROENCHEIS, O., MOALI, S., LIECHTI, H., BAUSCH, J., *Determination of lycopene in tissues and plasma of rats normal HPLC with photometric detection, 799, 291 – 299 (2000)*

19. BRAMLEY, P.M., *Is lycopene beneficial to human health?*, *Phytochemistry*, **54**(3), 233 – 236 (2000)
20. LEE, M.T., CHEN, B.H., *Stability of lycopene during heating and illumination in a model system*, *Food Chemistry*, **78**, 425 – 432 (2002)
21. WATZL, B., BUB, A., BLOCKHAUS, M., HERBERT, B.M., LUHRMANN, P.M., BERTHOLD, M., RECHKEMMER, G., *Prolonged tomato juice consumption has no effect on cell-mediated immunity of well-nourished elderly men and women*, *J. Nutr.*, **130**, 1719 – 1723 (2000)
22. COUNTRYMAN, C., BANKSON, D., COLLINS, S., LIN, W., *Lycopene inhibits the growth of the HL-60 promyelocytic leukemia cell line (abstract)*, *Clinica Chemica*, **37**, 1056 (1991)
23. BERTRAM, J.S., PUNG, A., CHURLY, M., KAPPOCK, T.J., WILKINS, S.R., COONEY, R.V., *Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation*, *Carcinogenesis*, **12**, 671 – 678 (1991)
24. ZHANG, L.X., COONEY, R.V., BERTRAM, J.S., *Carotenoids up-regulate connexin 43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties*, *Cancer Research*, **52**, 5707 – 5712 (1992)
25. KIM, H., *Carotenoids protect cultured rat hepatocytes from injury caused by carbon tetrachloride*, *Int. J Biochem Cell*, **27**, 1303 – 1309 (1995)
26. LEVY, J., BOSIN, E., FELDMEN, B., GIAT, Y., MIINSTER, A., DANILENKO, M., SHARONI, Y., *Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α -carotene or β -carotene*, *Nutr Cancer*, **24**, 257 – 266 (1995)
27. FUHRAMN, B., ELIS, A., AVIRAM, M., *Hypocholesterolemic effect of lycopene and β -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophage*, *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 658 – 662 (1997)
28. WANG, C.J., CHOU, M.Y., LIN, J.K., *Inhibition of growth and development of the transplantable C-6 glioma cells inoculated in rats by retinoids and carotenoids*, *Cancer Lett*, **48**, 135 – 142 (1989)

29. NAGASAWA, H., MITAMURA, T., SAKAMOTO, S., YAMAMOTO, K., *Effects of lycopene on spontaneous mammary tumour development in SHN virgin mice, Anticancer Research*, **15**, 1173 – 1178 (1995)
30. NARISAWA, T., FUKAURA, Y., HASEBE, M., ITO, M., AIZAWA, R., MURAKOSHI, M., UEMURA, S., KHACHIK, F., NISHINO, H., *Inhibitory effects of natural carotenoids, α -carotene, β -carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats, Cancer Letters*, **107**, 137 – 142 (1996)
31. SHARONI, Y., GIRON, E., RISE, M., LEVY, J., *Effects of lycopene enriched tomato oleoresin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced rat mammary tumours, Cancer Detect Prev*, **21**, 118 – 123 (1997)
32. KIM, J.M., TAKASVKA, N., SEKINE, K., OTA, T., ASAMOTO, M., MURAKOSHI, M., NISHINO, M., TSUDO, H., *Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH, Cancer Lett*, **120**, 15 – 22 (1997)
33. ASTROG, P., GRADELET, S., BERGES, R., SUSCHETET, M., *Dietary lycopene decreases initiation of liver preneoplastic foci by dietary nitrosamine in rat, Nutr Cancer*, **29**, 60 – 68 (1997)
34. OKAJIMA, E., TSUTSUMI, M., OZONO, S., AKAI, H., DENOLA, A., NISHINO, H., OSHIMA, S., SAKAMATO, H., KONISHI, Y., *Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine initiation, Jpn J Cancer Res*, **89**, 22 – 26 (1998)
35. GRADELET, S., LeBON, A.M., BERGES, R., SUSCHETET, M., ASTROG, P., *Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in rats: role of modulation of Aflatoxin B1 metabolism, Carcinogenesis*, **19**, 403 – 411 (1998)
36. IMAIDA, K., TAMANO, S., KATO, K., IKEDA, Y., ASAMOTO, M., TAKAHASHI, S., NIR, Z., MURAKOSHI, M., NISHINO, H., SHIRAI, T., *Lack of chemoprevention effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis, Carcinogenesis*, **22(3)**, 467–472 (2001)

37. GIOVANNUCCI, E., ASCHERIA, A., RIMM, E.B., STAMPFER, M.J., COLDITZ, G.A., WILLETT, W.C., *Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer, J Natl Cancer Inst, 87, 1767 – 1776 (1995)*
38. FRANCESCHI, S., BIDOLI, E., LaVECCIA, C., TALAMINI, R., D'AVANZO, B., NEGRI, E., *Tomatoes and risk of digestive-tract cancers, Int J Cancer, 59, 181 – 184 (1994)*
39. VanEEWYCK, J., DAVIS, F.G., BOWEN, P.E., *Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia, Int J Cancer, 48, 34 – 38 (1991)*
40. HELZLSOUER, K.J., COMSTOCK, G.W., MORRIS, J.S., *Selenium, lycopene, α -tocopherol, β -carotene, retinal and subsequent bladder cancer, Cancer Res, 49, 6144 – 6148 (1989)*
41. COODLEY, G.O., COODLEY, M.K., NELSON, H.D., *Micronutrients in HIV- infected women, J Wamens Health, 4, 303 – 311 (1995)*
42. PERIQUET, B.A., JAMMES, N.M., LAMBERT, W.E., TRICOIRE, J., MOUSSA, M.M., GARCIA, J., GHISOLFI, J., THOUVENOT, J.P., *Micronutrient levels HIV-1- infected children, AIDS, 9, 887 – 893 (1995)*
43. SCHMIDT, R., FAZEKAS, F., HAYN, M., SCHMIDT, H., KAPELLER, P., ROOB, G., SCHUMACHER, M., EBER, B., WEINRAUCH, V., KOSTNER, G.M., ESTERBAUER, H., *Risk factors for microangiopathy-related cerebral damage in Austrian stroke prevention study, J Nevrol Sci, 152, 15 – 21 (1997)*
44. OZTURK, Y., BASER, K.H.C., *İmmün sistem,kanser ve polisakkaritler, Bitkisel İlaç Ham Maddeleri Toplantı Bildirisi, Ankara, (1988)*
45. WALSH, G., *Tumour Necrosis Factors, Biopharmaceutical, ISBN. RS380.W35.1998, 209 – 215 (1998)*
46. WAGNER, H., JURČIĆ, K., *Introduction to immunology and immunological screening methods, Natural Product Sciences, 247 – 258*
47. LUETTIG, B., STEINMULLER, C., GIFFORD, G.E., *Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell*

- cultures of Echinacea purpurea*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **81** (9), 669 – 675 (1989)
48. JONES, A.L., SELEBYT, S., *Clinical applications of tumour necrosis factor*, *Progress in Growth Factor Research*, **1**, 107 – 122 (1989)
 49. KURODA, Y., HARA, Y., *Antimutogenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols*, *Mutation Research*, **436**, 69 – 97 (1999)
 50. DUKE, J.A., *CRC Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 93 – 94
 51. FUJIKI, H., SUGANUMA, M., OKABE, S., *Cancer inhibition by green tea*, *Mutation Research*, **402**, 307 – 310 (1998)
 52. FUJIKI, H., SUGANUMA, M., OKABE, S., *A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor - α and cancer preventive agents (-)-Epigallocatechin gallate and green tea –A Review*, *Cancer Detection and Prevention*, **24**(1), 91 – 99 (2000)
 53. HOLST-HANSEN, C., BRÜNNER, N., *MTT cell proliferation assay*, *Cell Biology. A Laboratory Handbook*. Edt: Celis, J.E., pp: 16 – 18, Academic press, San Diego, 1998
 54. MOSMANN, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, *Journal of Immunological Methods* **65**: 55 – 63 (1983)
 55. REILE, H., BIRNBOCK, H., BERNHARDT, G., SPRUSS, T., SCHONENBERGER, H., *Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture*, *Analytical Biochemistry* **187**: 262 – 267 (1990)
 56. VOET, D., VOET, J.G., *Biochemistry*. S: 553 – 554, John Wiley – Sons, Inc., New York, (1995)
 57. PROFIT, S., UNTEREGGER, G., *Quantitative measurement of cell proliferation using the BrdU ELISA: A comparison between colorimetric and chemiluminescent detection*, *Biochemica*, **4**, 33-35 (2001)
 58. HAWKER, J.R., *Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA synthesis*, *Journal of Immunological Methods*, **274**, 77-82 (2003)

59. GAUTHIER, D.T., CARTWRIGHT, D.D., DENSMORE, C.L., BLAZER, V.S., OTTINGER, C.A., *Measurement of leucocyte mitogenes in fish: ELISA based detection of the thymidine analogue 5-bromo-2'-deoxyuridine*, *Fish-Shellfish Immunology*, **14**, 279-288 (2003)
60. WAGNER, U., BURKHARDT, E., FAILING, K., *Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the ³H-thymidine incorporation assay*, *Veterinary Immunology and Immunopatology*, **70**, 151-159 (1999)
61. KORKMAZ, S., *Paksitaksel, kersetin ve berberinin A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi*, *Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir*, 19, 21, (2002)
62. MURPHY, G., *Modes for prostate cancer*, **37**, New York: Liss; 115-132 (1980)
63. KORKMAZ, S., KOŞAR, M., BAŞER, K.H.C., ÖZTÜRK, Y., *Effects of berberine on C6 glioma and NIH3T3 fibroblast cell lines*, (3rd *International Congress on Phytomedicine, 11-13 October 2000, Munich, Germany*) *Phytomedicine* 7(Suppl.): 123 (2000)
64. DENIZOT, F., LANG, R., *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*, *Journal of Immunological Methods*, **89**, 217-277 (1986)
65. MAGHNI, K., NICOLESCU, O. M., MARTIN, J. G., *Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assesment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ELISA*, *Journal of Immunological Methods*, **223**, 185-194 (1999)
66. SAVICKIENE, J., GINEITIS, A., *3-Deazauridine triggers dose-dependent apoptosis in myeloid leukemia cells and enhances retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells*, *The International Journal of Biochemistry-Cell Biology*, **(35)**, 1482-1494 (2003)

67. ANSARI, M.S., GUPTA, N.P., *A comparison of lycopene and orchidectomy alone in the management of advanced prostate cancer, BJU Int.*, **92** (4), 375-378 (2003)