

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MELAZMA TEDAVİSİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR VE OLASI
TOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Hülya TEZEL

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2023**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MELAZMA TEDAVİSİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR VE OLASI
TOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Hülya TEZEL

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU**

**ANKARA
2023**

ONAY SAYFASI

MELAZMA TEDAVİSİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR VE OLASI TOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Öğrenci: Hülya TEZEL

Danışman: Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU

Bu tez çalışması 06.01.2023 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Terken BAYDAR*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Doç. Dr. Gözde GİRGİN*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Dr. Öğr. Üy. Aylin BALCI ÖZYURT*
Bahçeşehir Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

26 Ocak 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

06/01/2023

Hülya TEZEL

“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezele ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın**ın önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın**ın önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir; gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın**ın önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Hülya TEZEL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında, değerli bilgilerini ve tecrübelerini esirgmeden bana yol gösteren ve karşılaştığım her sorunda sabır ve ilgiyle elinden geleni sunan, ekibinin bir parçası olduğumu hissettiren, öğrencisi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU'na

Yüksek lisans eğitimime katkı sağlayan ve benden bilimsel desteklerini ve emeklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma,

Çalışmalarım sürecinde akademik tecrübelerini ve desteklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Dilara ZEYBEK'e

Tez çalışmama başlarken ve çalışma süresi boyunca akademik tecrübelerini benimle paylaşıp sonsuz destek gösteren Moleküler Biyolog Deniz Arca ÇAKIR'a, Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN'e, Ecz. Sonia SANAJOU'ya, Ecz. Merve HAZAR'a, Ecz. İzem BİLİNMIŞ'e, Moleküler Biyolog Gözde IŞIK'a, Moleküler Biyolog Özlem BOZDEMİR'e,

Her an yanımda olan, desteğini ve tecrübesini esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Ecz. Nadir YALÇIN'a,

Her zaman yanımda olan ve destekleri ile bu zorlu süreçte yalnız bırakmayan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tezel, H. Melazma Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar ve Olası Toksik Etkilerinin *İn Vitro* Olarak Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Melazma, melanin pigmentini üreten melanositlerin sayısının ve aktivitesinin artmasına bağlı olarak özellikle de yüz gibi vücudun güneş ışınlarına daha fazla maruz kaldığı bölgelerdeki epidermis tabakasında ve/veya dermis tabakasında kahverengi veya gri-kahverengi melanin pigmentinin birikimiyle sonuçlanan, kronik, edinilmiş bir hastalıktır. Melazmanın etiyojisinde genetik yatkınlık, UV ışınlarına maruziyet, oral kontraseptifler, gebelik, tiroit fonksiyon bozuklukları, kozmetikler, fotoduyarlılığa neden olan ilaçlar gibi çok sayıda faktör rol oynamakla birlikte kesin nedeni bilinmemektedir. Melazma tedavisi etiyojisinin çok faktörlü olması nedeniyle zor ve karmaşıktır. Topikal olarak uygulanan tedavi seçenekleri geçici olarak iyileşmeyi sağlayabilir; ancak, hastalık çoğunlukla nüks eder. Tedavide sıklıkla tercih edilen hidrokinonun ciddi yan etkilerinin olabileceği bilindiğinden son yıllarda toksisitesi düşük, etkinliği yüksek ilaçların melazma tedavisinde kullanılması için araştırmalar yapılmaktadır. Farklı hastalıkların tedavilerinde kullanılan metformin ve askorbik asidin “ilaç yeniden konumlandırması” ile farklı alanlarda da kullanılabilmesi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yeni tedavi seçenekleri arasında olabileceği düşünülen metforminin, siklik adenozin monofosfat (cAMP) üzerinden melanin sentezinde rol oynayan genlerin ekspresyonunu inhibe edebileceği, bu sayede de melanositlerdeki melanin miktarının azalmasını sağlayabileceği düşünülmektedir. Askorbik asidin tirozinaz enziminin yapısındaki bakır iyonu ile etkileşerek tirozinaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu tez kapsamında MNT-1 insan melanoma hücre hattında askorbik asit, metformin ve askorbik asit+metformin kombinasyonunun melanin oluşumu, cAMP oluşumu, L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) düzeyleri, tirozinaz gen ekspresyonu ve düzeyleri, sitotoksikite ve oksidatif stres üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda uygulanan askorbik asidin ölçülen parametreleri anlamlı bir şekilde değiştirmediği belirlenmiştir. Metforminin ise, hücre içi reaktif oksijen türevleri (reactive oxygen species, ROS) düzeylerini ve tirozinaz düzeylerini anlamlı derecede arttırdığı görülmüştür. Kombine uygulama ile ise, hücre içi ROS düzeyleri ve tirozinaz düzeyleri anlamlı derecede yükselmiştir. Özellikle tirozinaz düzeyleri ve gen ekspresyonu dikkate alındığında, kombine uygulamanın melazma tedavisinde yararlı olamayacağı; askorbik asidin veya metforminin tek tek uygulamalarının ise sınırlı fayda sağlayabileceği söylenebilir. Ancak, bu konuda yapılacak kapsamlı in vivo çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: melazma, hiperpigmentasyon, MNT-1 hücreleri, *in vitro*, metformin, askorbik asit

ABSTRACT

Tezel, H. New Approaches in Melasma Treatment and *in Vitro* Evaluation of Possible Toxic Effects, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Toxicology Program, Master Thesis, Ankara, 2023. Melasma is a chronic, acquired disease that results in the accumulation of brown or gray-brown melanin pigment in the epidermis layer and/or dermis layer, especially in areas where the body is more exposed to sunlight, such as the face, due to the increase in the number and activity of melanocytes that produce the melanin pigment. Although many factors play a role in the etiology of melasma, such as genetic predisposition, exposure to UV rays, oral contraceptives, pregnancy, thyroid dysfunctions, cosmetics, drugs that cause photosensitivity, the exact cause is unknown. Melasma treatment is difficult and complex due to its multifactorial etiology. Topical treatment options may provide temporary relief, but the disease often recurs. Among the different treatment options, studies have shown that the combination of corticosteroid, retinoid derivatives and hydroquinone is the most effective treatment option in the treatment of hyperpigmentation. Since it is known that hydroquinone, which is frequently preferred in treatment, can have serious side effects, research have been carried out in recent years for the use of drugs with low toxicity and high efficiency in the treatment of melasma. Studies have shown that metformin and ascorbic acid, which are used in the treatment of different diseases, can also be used in different areas with "drug repositioning". It is thought that metformin may inhibit the expression of genes involved in melanin synthesis *via* cyclic AMP (cAMP) pathway, thus reducing the amount of melanin in melanocytes. It is known that ascorbic acid inhibits tyrosinase activity by interacting with the copper ion in the structure of the tyrosinase enzyme. Within the scope of this thesis, the effects of ascorbic acid, metformin and ascorbic acid on melanin formation, cAMP formation, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) levels, tyrosinase gene expression and levels, cytotoxicity and oxidative stress on MNT-1 human melanoma cell line. effects were evaluated. It was determined that ascorbic acid applied at non-cytotoxic concentrations did not significantly change the measured parameters. Metformin, on the other hand, was found to significantly increase intracellular ROS levels and tyrosinase levels. With the combined application, intracellular ROS levels and tyrosinase levels increased significantly. Considering especially tyrosinase levels and gene expression, combined application may not be beneficial in the treatment of melasma; it can be said that individual applications of ascorbic acid or metformin may provide limited benefit. However, extensive *in vivo* studies are needed on this topic.

Keywords: melasma, hyperpigmentation, MNT-1 cells, *in vitro*, metformin, ascorbic acid

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER	xviii
TABLolar	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Derinin Yapısı	3
2.1.1. Epidermis	3
2.1.2. Dermis	4
2.1.3. Hipodermis	4
2.2. Ciltte Pigment Üretimi ve Pigment Üretimini Etkileyen Faktörler	6
2.2.1. Melanin Pigmenti ve Türleri	6
2.2.2. Melanositler ve Melanoblastlar	7
2.2.3. Melanogenez	8
2.2.4. Melanogenezde Rol Oynayan Sinyal Yolakları	10
2.3. Melazma	15
2.3.1. Epidemiyoloji	16
2.3.2. Etiyoloji	16
2.3.3. Patogenez	20
2.3.4. Tedavi	21
2.4. MNT-1 Hücre Hattı	26
2.5. Metformin	27
2.6. Askorbik Asit (C Vitamini)	30

3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	33
3.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Hattı	34
3.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	34
3.4.1. Metformin Hidroklorür Çözeltisinin Hazırlanması	34
3.4.2. L-askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	34
3.4.3. Besiyerinin Hazırlanması	35
3.4.4. MNT-1 Hücrelerinin Lizis İşleminde Kullanılan Çözeltiler	35
3.4.5. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	36
3.4.6. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	37
3.4.7. Reaktif Oksijen Bileşikleri Tayininde Kullanılan Çözeltiler	37
3.4.8. Işık Mikroskobu İncelemelerinde Kullanılan Çözeltiler	38
3.4.9. Tirozinaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	38
3.4.10. Tirozinaz Gen Ekspresyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	41
3.4.11. Tirozinazın İmmunfloresan Olarak İşaretlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	42
3.4.12. Melanin Oluşumunun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	43
3.4.13. c-AMP Oluşumunun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.14. L-DOPA Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	47
3.5. Deneysel İşlemler	48
3.5.1. <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü	48
3.5.2. Çalışma Grupları	48
3.5.3. Hücre Kültüründe Çözme ve Dondurma İşlemleri	49
3.5.4. Hücrelerin Alt Kültür Prosedürü	52
3.5.5. Hücre Sayımı İşlemi	53
3.6. Yöntemler	55
3.6.1. MNT-1 Melanoma Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiyazol- 2- il)-2,5- Difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	55
3.6.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi	57

3.6.3. Tirozinaz Aktivitesinin Belirlenmesi	59
3.6.4. Tirozinaz Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi	61
3.6.5. Tirozinazın İmmunofloresan Olarak İşaretlenmesi	66
3.6.6. Melanin Oluşumunun Belirlenmesi	68
3.6.7. cAMP Oluşumunun Belirlenmesi	70
3.6.8. L-DOPA Düzeylerinin Belirlenmesi	72
3.6.9. Protein Düzeyinin Belirlenmesi	73
3.6.10. İstatistiksel Değerlendirme	74
4. BULGULAR	75
4.1. MTT Yöntemi İle Sitotoksitenin Belirlenmesi	75
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi	77
4.3. Tirozinaz Düzeylerinin Belirlenmesi	78
4.4. Tirozinaz Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi	79
4.5. Sitopatoloji	82
4.6. Tirozinazın İmmünfloresan Olarak İşaretlenmesi	85
4.7. Melanin Oluşumunun Belirlenmesi	87
4.8. cAMP Oluşumunun Belirlenmesi	88
4.9. L-DOPA Düzeylerinin Belirlenmesi	89
5. TARTIŞMA	91
5.1. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi	94
5.1.1. Askorbik Asidin Sitotoksitesi	95
5.1.2. Metforminin Sitotoksitesi	97
5.2. Hücre İçi ROS Oluşumunun Değerlendirilmesi	98
5.2.1. Askorbik Asidin ROS Oluşumu Üzerine Etkileri	98
5.2.2. Metforminin ROS Oluşumu Üzerine Etkileri	99
5.3. Tirozinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	100
5.3.1. Askorbik Asidin Tirozinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	100
5.3.2. Metforminin Tirozinaz Düzeyleri Üzerine Etkisi	101
5.4. Tirozinaz Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	102
5.4.1. Askorbik Asidin Tirozinaz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	102
5.4.2. Metforminin Tirozinaz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	103
5.5. Sitopatoloji	104

5.5.1. Askorbik Asit Uygulaması Sonrasında Sitopatoloji	104
5.5.2. Metformin Uygulaması Sonrasında Sitopatoloji	104
5.6. Tirozinazın İmmünfloresan Olarak İşaretlenmesi	105
5.7. Melanin Oluşumunun Değerlendirilmesi	106
5.7.1. Askorbik Asidin Melanin Oluşumu Üzerine Etkisi	106
5.7.2. Metforminin Melanin Oluşumu Üzerine Etkisi	107
5.8. cAMP Oluşumunun Değerlendirilmesi	109
5.8.1. Askorbik Asidin cAMP Oluşumu Üzerine Etkisi	109
5.8.2. Metforminin cAMP Oluşumu Üzerine Etkisi	109
5.9. L-DOPA Düzeylerinin Belirlenmesi	111
5.9.1. Askorbik Asidin L-DOPA Düzeylerine Etkisi	111
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	112
7. KAYNAKLAR	116
8. EKLER	
Ek-1: Dijital Makbuz	
Ek-2: Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α-MSH	Melanosit uyarıcı hormon, melanotropin, melanokortin (Melanocyte stimulating hormone)
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
A375	Malign melanoma hücre hattı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AHR	Aril hidrokarbon reseptörü
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	AMP ile aktive olan protein kinaz
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi (Analysis of variance)
ATCC	American Type Cell Collection
ATP	Adenozin trifosfat
bFGF	Temel fibroblast büyüme faktörü (Basic fibroblast growth factor)
BMP	Kemik morfogenetik proteinleri (Bone morphogenetic proteins)
BSA	Sığır serum albümin (Bovine serum albumin)
Ca⁺²	Kalsiyum
CAMKII	Kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz II (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II)
cAMP	Siklik adenozin monofosfat (Cyclic adenosine monophosphate)
cGMP	Siklik guanozin monofosfat (Cyclic guanosine monophosphate)
CM-DCF	2',7'-diklorofloresein
CM-H₂DCFDA	5- ve 6- klorometil-2',7'- diklorodihidrofloresein diasetat
CO₂	Karbondioksit

CREB	cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (cAMP-response element binding protein)
CTCF	Düzeltilmiş toplam hücre floresansı (Corrected total cell fluorescence)
DAG	Diaçilgliserol
DCT	Dopakrom tautomeraz
DHI	5,6-dihidroksiindol
DHICA	5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
DQ	Dopakinon
EDN1 veya ET-1	Endotelin 1
EDNRB veya ETB	Endotelin reseptör tip B
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EF-2	Uzama faktörü-2 (Elongation factor-2)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Östrojen reseptörü (Estrogen receptor)
ERK1/2	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz $\frac{1}{2}$ (Extracellular signal-regulated protein kinase $\frac{1}{2}$)
FBS	Fötal Sığır Serumumu (Fetal bovine serum)
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi (The U.S. Food and Drug Administration)
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü (Fibroblast growth factor receptor)
FITC	Floresein izotiyosiyanat
G361	Malign melanoma hücre hattı
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörü (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GPCR	G Protein Kenetli Reseptör (G-protein coupled receptor)

GPER	G-protein-kenetli östrojen reseptörü (G-protein coupled estrogen receptor)
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz 3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta)
HGF	Hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte growth factor)
HQ	Hidrokinon
HRP	Avidin-Horseradish Peroksidaz
IL-1	İnterlökin 1
IP3	İnositol-trifosfat
IPL	Yoğun atımlı ışık (Intense pulsed light)
IR	Kızılötesi (Infrared) ışınları
ITGA6	İntegrin alfa 6
IU	Uluslararası birim (ünite)
KGF	Keratinosit büyüme faktörü (Keratinocyte growth factor)
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin
LEF1/TCF	Lenfoid arttırıcı bağlama faktörü-1/T hücre faktörü (T cell factor/lymphoid enhancer factor)
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MART-1	Melanoma Antigen Recognized By T-Cells
MASI	Melazma alanı ve şiddet indeksi (Melasma area and severity index)
MC1R	Melanokortin 1 reseptörü
MelasQoL	Melasma yaşam kalitesi skalası (Melasma quality of life scale)
mg	Miligram
MITF	Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü (Microphthalmia-associated transcription factor)
ml	Mililitre
mMASI	Modifiye melazma alanı ve şiddet indeksi (Modified melasma area and severity index)
MNT-1	Lenf nodunda metastaz yapmış insan melanoma hücre hattı
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol- 2- il) – 2,5 – Difeniltetrazolyum bromür
Na₂BH₄	Disodyum tetrahidroborat

Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH₂PO₄	Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NGF	Sinir büyüme faktörü (Nerve growth factor)
NHS	Normal insan serumu (Normal human serum)
NO	Nitrik oksit
NRG	Nöregulin
NSAİİ	Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar
O₂•	Süperoksit radikali
OH•	Hidroksil radikali
OPN	Opsin
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PBS	Fosfat tamponlu salin (Phosphate buffered saline)
PAQR7	Progesteron, progestin ve adipoQ reseptörü
PAX3	Eşleştirilmiş kutu 3 (Paired Box 3)
PGE2	Prostaglandin E2
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C (Phospholipase C)
POMC	Proopiomelanokortin (Proopiomelanocortin)
PR	Progesteron reseptörü
PRODH/POX	Prolin dehidrogenaz/prolin oksijenaz (Proline dehydrogenase/proline oxidase)
QS	Q-anahtarlı lazer (Q-switch lasers)
Ras-MAPK	Ras-mitojenle aktive olan protein kinaz (Ras- mitogen-activated protein kinase)
ROS	Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species)
RT-qPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time quantitative polymerase chain reaction)

SCCS	Avrupa Birliği Tüketici Güvenliği Bilimsel Komitesi (European Union The Scientific Committee on Consumer Safety)
SCF	Kök hücre faktörü (Stem cell factor)
SD	Standart sapma (Standard deviation)
SDC2	Sindekan 2
SEM	Ortalamanın standart sapması (Standard error of mean)
SKMel28	Malign melanoma hücre hattı
SOS protein	Son of sevenless protein
STAT3	Transkripsiyon 3 aktivatörü (Signal transducer and activator of transcription 3)
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming growth factor beta)
THFA	Tetrahidrofuroik asit
TIMP3	Doku metalloproteinaz 3 inhibitörü (Tissue inhibitor of metalloproteinase 3)
TNC1	Tenascin C1
TNFRSF12A	Tümör nekroze faktör reseptör süperailisi üyesi 12A (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A)
TRP-1	Tirozinaz ile ilişkili protein-1 (Tyrosinase related protein-1)
TRP-2	Tirozinaz ile ilişkili protein-2 (Tyrosinase related protein-2)
TYR	Tirozinaz (Tyrosinase)
UV	Morötesi (Ultraviyole) ışınları
WM9	İnsan metastatik melanoma hücre hattı
WST	Suda çözünür tetrazolyum tuzu (Water soluble tetrazolium salt)

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Derinin tabakaları	5
2.2. Melanositlerin yapısı.	7
2.3. Melanin biyosentezi.	9
2.4. Melanogenezde rol oynayan sinyal yolları	15
2.5. Metforminin kimyasal yapısı	28
2.6. Metforminin etki mekanizması	29
2.7. L-askorbik asidin kimyasal yapısı.	31
3.1. Dehidrogenazlar ile canlı hücrelerde MTT'nin formazan kristallerine dönüşmesi	57
4.1. Askorbik asitin 0,1-25 μ M konsantrasyon aralığında MNT-1 hücre canlılığı üzerine etkisi	75
4.2. Askorbik asitin 0,1-25 μ M konsantrasyon aralığında MNT-1 hücre canlılığı üzerine etkisi	76
4.3. Metformin hidroklorürün 50-5000 μ M konsantrasyon aralığında MNT-1 hücre canlılığı üzerine etkisi.	76
4.4. Metformin hidroklorürün 50-5000 μ M konsantrasyon aralığında MNT-1 hücre canlılığı üzerine etkisi	77
4.5. Çalışma gruplarında ROS düzeyleri.	78
4.6. Çalışma gruplarında tirozinaz düzeyleri.	79
4.7. β -aktin amplifikasyon grafiği.	80
4.8. β -aktin erime grafiği.	80
4.9. Tirozinaz amplifikasyon grafiği.	81
4.10. Tirozinaz erime grafiği.	81
4.11. Çalışma gruplarında tirozinaz gen ekspresyon düzeyleri.	82
4.12. Deney gruplarının faz kontrast mikroskop görüntüsü.	83
4.13. Deney gruplarının daha büyük büyütmesinde flask tabanına tutunan iğsi MNT-1 hücreleri.	83
4.14. Deney gruplarının faz kontrast mikroskop görüntüsü.	84

4.15. Deney gruplarının daha büyük büyütmesinde faz kontrast mikroskop görüntüsü.	84
4.16. Deney gruplarında anti-tirozinaz ile indirekt immunfloresan işaretleme.	85
4.17. Deney gruplarında anti-tirozinaz ile indirekt immunfloresan işaretlemeye ait görüntülerin daha büyük büyütmesi.	86
4.18. Kantitatif floresan görüntü analizi.	87
4.19. Çalışma gruplarında melanin düzeyleri.	88
4.20. Çalışma gruplarında cAMP düzeyleri.	89
4.21. Çalışma gruplarında L-DOPA düzeyleri.	90

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Melazma tedavi seçenekleri, etki mekanizmaları ve advers etkileri.	24
4.1. MNT-1 Hücrelerinde Askorbik Asit ve Metformin Hidroklorürün Dozları	77
4.2. Çalışma gruplarında ROS düzeyleri.	78
4.3. Çalışma gruplarında tirozinaz düzeyleri.	79
4.4. Çalışma gruplarında tirozinaz gen ekspresyon düzeyleri.	82
4.5. Çalışma gruplarında melanin düzeyleri.	88
4.6. Çalışma gruplarında cAMP düzeyleri.	89
4.7. Çalışma gruplarında L-DOPA düzeyleri.	90

1. GİRİŞ

İnsan derisi, temel işlevleri yerine getiren fiziksel bir bariyer olmasının yanı sıra harekete izin veren esnek bir vücut örtüsüdür. Ana işlevlerden biri, ultraviyole (UV), infrared (IR) ve görünür ışıktan gelen radyasyon; çevresel kirlenmeler ve kimyasallar, biyolojik etmenler ve mekanik yaralanma gibi çok çeşitli uyarılara karşı vücudun korunmasını sağlamaktır. Cilt, güneş ışınlarından korunmak için epidermisteki melanositler, keratinositler ve dermisteki fibroblastlar gibi önemli hücrelerel bileşenleri içeren ve pigmentasyon adı verilen özel ve karmaşık bir mekanizma kullanır. Cilt pigmentasyonu, genetik olarak belirlenmiş ve sentezlenmiş melanin seviyesini yansıtır ve temel olarak keratinositlerde melanin granüllerinin birikmesinden kaynaklanır. Pigmentasyon süreci çeşitli iç ve dış faktörler tarafından uyarılabilir (1,2).

Melazma, deride kronik ve bölgesel melanin pigmenti üretimiyle sonuçlanan bir fonksiyon bozukluğudur. UV ışınlarına aşırı maruziyet, gebelik, oral kontraseptifler ve steroidler gibi hormon preparatlarının kullanımı, over tümörleri, fotoduyarlılığa neden olan kozmetiklerin ve ilaçların kullanımı gibi bazı faktörler tanımlanmasına rağmen, hastalığın kesin nedeni bilinmemektedir (1,3,4). Tedavi genelde melanin pigmentini üreten hücrelerin aktivitelerinin baskılanması, melanin pigmentinin üretiminin baskılanması, melaninin deriden uzaklaştırılması ve melanin pigmentinin saçılması olmak üzere dört temel mekanizma üzerinden gerçekleştirilir. Sıklıkla kullanılan tedavi yöntemleri arasında depigmente edici ajanlar, soyucu ajanlar, lazer ve ışın tedavileri yer almaktadır (5). Uygun tedavinin ardından melazmanın tekrar etmesini önlemek için UV ışınlarından korunmak önem taşımaktadır (6,7). Her tedavi seçeneğinin farklı başarı oranları ve tedavi ile ilişkili advers etki riskleri bulunmakla birlikte, melazmanın tedavisi nüks etmeye eğilimli olduğu için oldukça inatçıdır (5-7). Mevcut çalışmalardan elde edilen sonuçlar, topikal olarak uygulanan depigmentasyon ajanlarının, bunların içerisinde de kortikosteroid ve retinoid türevleri ile birlikte hidrokinon (HQ) içeren preparatların hiperpigmentasyon tedavisinde en etkili tedavi seçeneği olduğunu göstermektedir.

Melazma tedavisinde kullanımda olan etkin maddelerin çoğunun, özellikle de son yıllarda sıkça tercih edilen HQ'nun ciddi yan etkilerini olabileceği bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda toksisitesi düşük, etkinliği yüksek olan ilaçların melazma tedavisinde kullanılması için araştırmalar yapılmaktadır. Metformin ve askorbik asit gibi zaten kullanımda olan bazı ilaçların "ilaç yeniden konumlandırması" ile farklı alanlarda da kullanılabilmesine dair son yıllarda artan sayıda çalışma yapılmaktadır. Yeni tedavi seçenekleri arasında olabileceği düşünülen metforminin, siklik AMP (cAMP) birikimini ve cAMP aracılı protein fosforilasyonunu engelleyerek mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü (MITF), tirozinaz, tirozinaz ile ilişkili protein 1 ve tirozinazla ilişkili protein 2 gibi melanin sentezinde rol oynayan genlerin ekspresyonunu inhibe edebileceği, bu sayede de melanositlerdeki melanin miktarının azalmasını sağlayabileceği düşünülmektedir (6,8).

Askorbik asitin aktif formu olan L-askorbik asit, tirozinaz enziminin yapısında yer alan bakır iyonu ile etkileşerek tirozinaz aktivitesini inhibe eder ve enzim inhibisyonu sayesinde dopakinon bileşiğinin L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA)'ya dönüşümünü azaltarak melanogenez inhibisyonunu sağlar (9). Aynı zamanda, melanogenez arttırdığı bilinen serbest radikal üretimini azaltarak, hem UV-A hem de UV-B radyasyona karşı koruyucu etki gösterir (10). Bu amaçla özellikle cAMP inhibisyonu yapan ve takiben de tirozinaz inhibisyonu yaptığı belirtilen metformin ve yine tirozinaz inhibisyonu yapan askorbik asidin melazma tedavisinde kullanımı gündeme gelmiştir.

Bu tez kapsamında MNT-1 insan melanoma hücre hattında metformin ve/veya askorbik asitin melanin oluşumu, cAMP oluşumu, L-DOPA düzeyleri, tirozinaz gen ekspresyonu ve aktivitesi, sitotoksosite ve oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Yapısı

Deri, canlıları çevresel uyaranlardan koruyan, aynı zamanda canlıların çevre ile etkileşimde olmasını sağlayan karmaşık bir organdır. Deri hücre, doku ve matriks elemanlarının bütünleşik düzenlemesinden oluşan ve fiziksel bir geçirgenlik bariyeri görevi görme, enfeksiyona neden olabilecek ajanlardan koruma, vücuttan fazla su kaybının önlenmesi, termoregülasyon, D vitamini sentezi ve UV ışınlarından korunmanın yanı sıra, yara onarımı ve rejenerasyonunun sağlanması gibi farklı işlevleri olan dinamik bir komplekstir (11–13).

Deri temel olarak üç tabakadan oluşur: epidermis, dermis ve deri altı doku olarak da bilinen hipodermis (12).

2.1.1. Epidermis

Derinin en dış tabakası epidermis olarak adlandırılır. Epidermisin %95'ini keratinositler oluşturur. Epidermisin kalınlığı vücudun bölümüne, yaşa ve cinsiyete göre değişkenlik gösterebilir. Epidermis, keratinosit farklılaşmasının durumuna göre kendi içinde 4 tabakaya ayrılabilir. En altta tek sıra keratinositlerden oluşan *Stratum basale* yer alırken, bu tek sıra hücrelerin üst üste birikmesiyle *Stratum spinosum* ve *Stratum granulosum* oluşur. *Stratum basale*'de yer alan keratinositler çoğalarak ortalama 40 günlük bir süre içerisinde bütün tabakaları kat eder ve en üstte yer alan neredeyse tümüyle ölmüş hücrelerden oluşan boynuzsu tabakayı yani *Stratum corneum*u oluşturur. *Stratum corneum*u oluşturan keratinositler çekirdeklerini ve sitoplazmik organellerini kaybetmişlerdir. Bu hücrelerin plazma zarları, involukrin ve lorikrin dahil olmak üzere çözünür protein öncüllerinin çapraz bağlanmasıyla oluşturulan, yüksek oranda çözünmeyen kornifiye zarflar içerir. Ayrıca, üst canlı epidermisteki lameller cisimlerden salgılanan yağ asitleri, steroller ve seramidler gibi lipitlerden oluşur (14,15). Epidermisin keratinositler dışında kalan %5'ini ise melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri oluşturur. Langerhans

hücreleri, kemik iliğinden köken alan, antijen sunan dendritik hücrelerdir. Bu hücreler, kutanöz bağışıklık sisteminin en dıştaki koruyucusu olarak hareket eder ve epidermisteki uyarımı takiben lenf düğümlerine göç ederek deri yoluyla karşılaşılan patojenlere karşı ilk reaksiyonları başlatırlar (16,17). Merkel hücreleri ise, duyu bilgileri deriden duyu sinirlerine ileten epitelyal nöroendokrin hücrelerdir. Kromogranin A gibi nöroendokrin belirteçleri ve nöropeptitler gibi çeşitli nörosekretuar maddeleri içerir. Bu maddelerin bazıları nörotransmitter olarak çalışırken, bazıları ise kutanöz hücre tiplerinin büyümesini ve farklılaşmasını destekler (17).

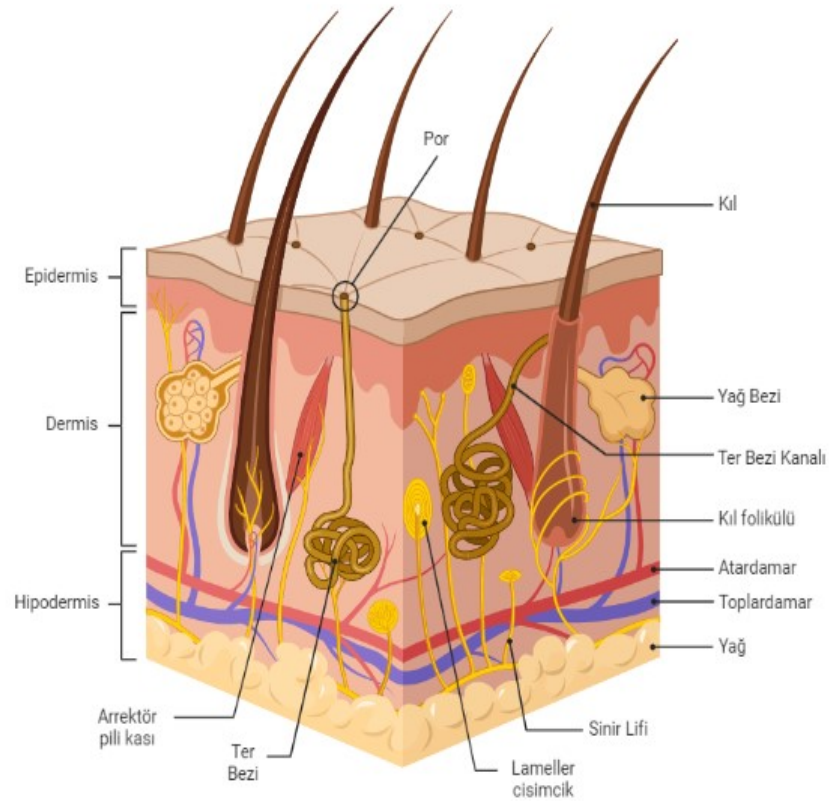
2.1.2. Dermis

Epidermis, kutanöz bazal membran ile dermisten ayrılır (14). Bazal membran ve epidermisin altında, cilde yapısal ve besinsel destek sağlayan dermis tabakası yer alır. Dermis, epidermisten 15-40 kat daha kalın bir tabakadır (17). Yüzeysel olan papiller tabaka ve daha derin olan retiküler tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur. Papiller tabaka, epidermisin altında yer alan ince bir dermis tabakasıdır. Retiküler tabaka, başlıca tip I kollajen lif demetleri ve kaba elastik liflerden oluşan bağ dokusudur. (14,17). Kollajen lifler ve elastik doku gibi interstisyel bileşenlere ek olarak antijenleri fagosite eden ve T hücrelerine antijen sunan hücreler olan histiyositler ve dermal kan damarlarının yakınında bulunan ve alerjik reaksiyon sırasında histamin gibi kemotransmitterlerin salgılanmasından sorumlu olan mast hücreleri gibi hücresel bileşenlerden oluşur. Dolaşım ve dokuların beslenmesini sağlayan yüzeysel kan damarları ve derin nörovasküler pleksuslar dışında lenfatik kanallar, yağ ve ter bezleri, kıl folikülleri, serbest sinir uçları, titreşimi algılayan Pacinian cisimciklerini içeren uç cisimcikleri ve dokunma ve basınç duyusunun algılanmasından sorumlu Meissner cisimcikleri de dermis tabakasında yer alır (14).

2.1.3. Hipodermis

Hipodermis ya da deri altı (subkütan) doku derinin en iç tabakasıdır ve yağ hücrelerinden oluşur. Yağ hücreleri, birbirinden *fibröz septa* ile ayrılan yağ lobülleri

halinde düzenlenmiştir (14,18). Lobüller içinde iki tip adiposit bulunabilir. Deri altı yağdaki adipositlerin çoğu, büyük bir merkezi damlacık ve periferik olarak yerleştirilmiş bir çekirdeğe sahip küresel hücreler olan beyaz adipositlerdir. Beyaz adipositler, enerji depolanmasında görev alır. Deri altı yağdan daha çok visceral yağ dokusunda bulunan kahverengi adipositler, birkaç lipid damlacığına, yuvarlak bir çekirdeğe ve birçok mitokondriye sahip poligonal hücrelerdir. Bu adipositler, termoregülasyondan sorumludur. Hipodermiste adipositlere ek olarak vasküler sistemin geniş bir kılcal ağı vardır. Bu kılcal ağ, insülin gibi subkütan olarak enjekte edilen ilaçların hızlı bir şekilde absorpsiyonuna olanak sağlar (17). Şekil 2.1’de derinin tabakaları şematize edilmiştir.



Şekil 2.1. Derinin tabakaları

2.2. Ciltte Pigment Üretimi ve Pigment Üretimini Etkileyen Faktörler

2.2.1. Melanin Pigmenti ve Türleri

Melanin, cilt ve saçın pigmentasyonundan ve cilt ve gözün ışık koruması dahil olmak üzere birçok biyolojik işlevinden sorumlu olan büyük bir molekül grubunu tanımlamak için kullanılan bir terimdir (19,20). Melanin pigmentinin moleküler yapısı, UV ve görünür ışığı absorbe etmek için çok uygundur ve bu sayede deriyi ve gözü güneş ışığından gelen UV radyasyonuna (UVR) karşı koruma görevi görür (20,21). İnsanlarda melanin pigmenti, eumelanin, feomelanin ve nöromelanin olmak üzere üç formda bulunur (19).

Eumelanin

Eumelanin çapraz bağlı 5,6-dihidroksiindol (DHI) ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit (DHICA) bileşenlerinden oluşan koyu kahverengi ve/veya siyah renkli düşük çözünürlüğe sahip bir polimerdir (19,22).

Feomelanin

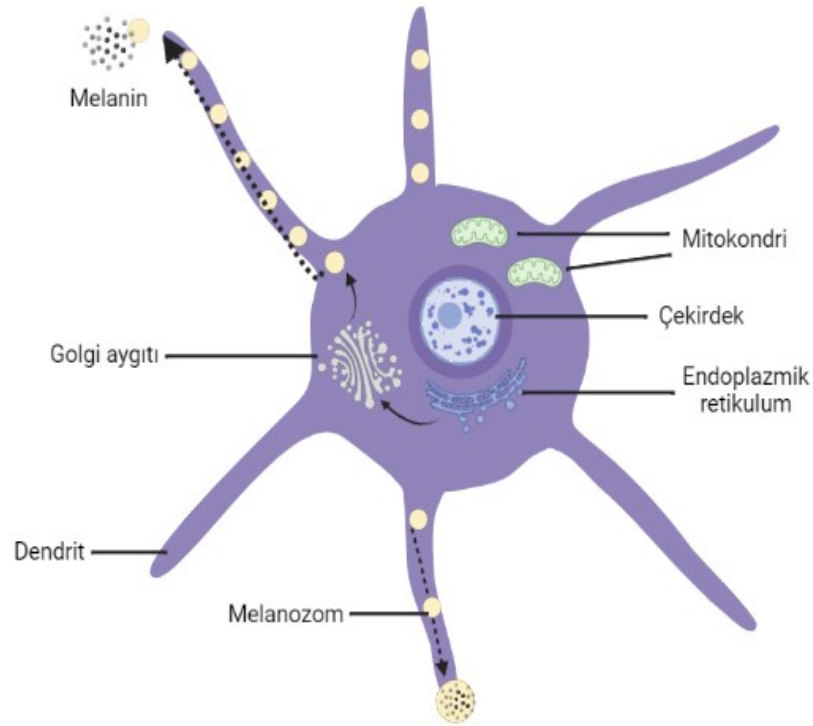
Feomelanin kırmızı ve/veya sarı renkte, eumelanin pigmentine göre daha çözünürlüğü yüksek olan polimerik yapıda bir pigmenttir. Sistein veya glutatyonun konjugasyonu ile oluşur. Feomelaninin kimyasal yapısı, benzotiyazin ve benzotiyazol birimleri içermesi bakımından eumelanininkinden farklıdır (19,22,23).

Nöromelanin

Nöromelanin, beyindeki spesifik katekolaminerjik nöron popülasyonunda bulunan koyu renkli bir polimerdir. İnsanlarda bulunan nöromelaninin potansiyel olarak demir ve diğer geçiş metallerine etkili bir şekilde bağlandığına dair çalışmalar olmasına rağmen, biyolojik işlevi hala bilinmemektedir. Apoptoz ve Parkinson hastalığında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (19).

2.2.2. Melanositler ve Melanoblastlar

Melanositler, omurgalı embriyolarında kapanan nöral tüpün dorsal kısımlarından köken alan, insan derisinde, saç foliküllerinde, gözlerde, iç kulakta, kemiklerde, kalpte ve beyinde bulunan ve melanin pigmentini üreten dendritik hücrelerdir. Melanositlerin öncü hücreleri olan melanoblastlar, embriyonik nöral krest hücrelerinden köken alan ve pigment içermeyen hücrelerdir. Nöral tüpün kapanmasının ardından melanoblastlar vücudun çeşitli bölgelerine göç ederek melanositlerin yanı sıra periferik sinir sistemi hücreleri, başın kemik ve kıkırdak hücreleri ve gözün koroid hücrelerine dönüşürler (12,21,22,24,25). Melanositlerin yapısı Şekil 2.2’de gösterilmektedir. Melanositlerin göç etme, çoğalma ve farklılaşma sürecini nöral tüp hücreleri, ektoderm hücreleri ve keratinositler dışında Wnt glikoprotein ailesi, endotelin 3 ve kök hücre faktörü de etkilemektedir (24,25).



Şekil 2.2. Melanositlerin yapısı.

2.2.3. Melanogenez

Epiderminin bazal hücreleri arasında bulunan melanositlerde gerçekleşen melanin pigmentinin üretimi ve dağıtımı “melanogenez” olarak isimlendirilir. Melanogenez melanositlerdeki melanozomlarda meydana gelen bir dizi enzimatik ve kimyasal reaksiyonun kombinasyonunu içeren karmaşık bir yoldur (23,26,27). Melanin pigmentinin biyosentez yolağı 1930 ve 1940 yılları arasında bu yolağı keşfeden Raper ve Mason isimli bilim insanlarına ithafen Raper Mason yolağı olarak da bilinmektedir (24). Melanogenez yolağında 3 ana enzim yer alır: tirozinaz (TYR), tirozinazla ilişkili protein 1 [TRP-1 veya glikoprotein 75 (gp75)] ve tirozinazla ilişkili protein 2 (TRP-2, dopakrom tautomeraz veya DCT) (27,28). Katekolaminlerin sentezi için gerekli olan tirozin aminoasidinin, tirozinaz enzimi (tirozin oksidaz, DOPA oksidaz, monofenol, L-dopa: oksijen oksidoredüktaz) ile 3,4 dihidroksi-fenilalanin (L-DOPA) bileşiğine oksidasyonu eumelanin ve feomelanin pigmentlerinin biyosentezinin başlangıç noktasıdır. Bu reaksiyonunun inhibe edilmesi melanin üretiminin durmasına neden olduğu için, tirozin aminoasidinin L-DOPA'ya dönüşümünün melanin biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamak olduğunu düşündürmektedir. L-DOPA daha sonra tirozinaz enzimi ile L-DOPAKinona (DQ) oksitlenir. Dopakinon oluşumundan sonra melanogenez yolağı “siyah-kahverengi eumelanin” ve “kırmızı-sarı feomelanin” pigmentleri için 2 farklı yola ayrılır. Eumelanogenez yolağında reaksiyon L-DOPAKinona bir amino grubunun intramoleküler olarak eklenmesi ile devam eder ve bu reaksiyon sonucunda DOPAKrom sentezlenir. DOPAKrom ya kendiliğinden 5,6-dihidroksiindole (DHI) dönüşür ya da TRP-2 tarafından enzimatik olarak 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik aside (DHICA) dönüştürülür. Son olarak, indol ve kinonların polimerizasyonu sonucunda eumelanin oluşur (12,23,28). Feomelanogenez yolağında ise, dopakinon sistein veya glutatyon varlığında 5-S-sisteinil dopa veya glutatyonil dopaya dönüştürülür. Bu bileşenlerin oksidasyonu ile benzotiyazin ara ürünleri oluşur ve sonunda feomelanin üretilir (23). Melanin biyosentezi Şekil 2.3'te yer almaktadır.

2.2.4. Melanogenezde Rol Oynayan Sinyal Yolakları

G Protein Kenetli Reseptör (GPCR) Aracılı Sinyal Yolakları

Proopiomelanokortin Kaynaklı Peptidler

Melanosit uyarıcı hormon (α -MSH, melanotropin, melanokortin) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH), insanlarda melanogenezin indüklenmesinde rol oynayan iki melanokortin peptididir. ACTH ve α -MSH'nin her ikisi de proteolitik bölünme ile proopiomelanokortin (POMC) adı verilen aynı öncü molekülden türemiştir. Orijinal olarak ön hipofizde keşfedilmesine rağmen, POMC ve melanokortin peptitleri insan epidermal keratinositleri, melanositler ve Langerhans hücreleri tarafından da eksprese edilir ve salgılanır. α -MSH ve ACTH bir G protein kenetli reseptör (GPCR) olan melanokortin 1 reseptörüne (MC1R) bağlanarak melanogenezi düzenleyen peptitlerdir. Bu moleküllerin MC1R reseptörlerine bağlanması, hücre içi cAMP'yi artıran adenilat siklazın G proteinine bağlı aktivasyonunu ve bunun sonucunda protein kinaz A'nın (PKA) uyarılmasını indükler. cAMP artışını takiben, cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) fosforilasyon ile aktive edilir ve son olarak MITFgeninin transkripsiyonunu uyarır. Bu da sırayla TYR, TRP-1 ve TRP-2 gibi melanogenez ile ilgili anahtar enzimlerin transkripsiyonunu uyararak melanogenezi indükler (2,23,31).

Endotelin-1 Sinyal Yolağı

Yirmi bir amino asitten oluşan bir polipeptit olan endotelin 1 (EDN1 veya ET-1) ilk olarak vasküler endotel hücrelerinde tanımlanmış olan bir moleküldür. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda insan keratinositleri tarafından sentezlendiği de belirlenmiştir. EDN1, bir G-protein-kenetli reseptör olan endotelin reseptör tip B'ye (EDNRB veya ETB) bağlandığında, fosfolipaz C aktive olur ve fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP2) hidrolizinin artışına bağlı olarak inositol-trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşur. İnositol-trifosfat (IP3), Ca^{+2} 'un hücre içi konsantrasyonunu artırır ve diaçilgliserol (DAG), protein kinaz C'nin (PKC)

aktivasyonunu indükler. Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağının aktive olmasıyla CREB fosforilasyonu ve son olarak MITF geninin transkripsiyonu uyarılır. UV-B ışınlarının insan derisinde endotelin-1 (EDN1) yolağıyla TYR ve TRP-1'in ekspresyon seviyelerini dolayısıyla pigmentasyonu arttırdığı bilinmektedir (2,32).

Wnt Sinyal Yolağı

Wnt sinyal yolağı embriyonal gelişim, doku homeostazı, melanogenez gibi farklı işlevlerde rol oynayan bir yolaktır. Wnt gen familyasının birinci üyesi olan “Int-1” geninin farelerde bulunan bir proto-onkogen olduğunun keşfedilmesinin ardından *Drosophila melanogaster*'daki “wingless” geninin “Int-1” geni ile hem fonksiyon hem de dizi benzerliği gösterdiği bulunmuştur. İlgili genlerin homolog genler olduğunun bulunması üzerine iki gen ismi birleştirilerek “Wnt” olarak isimlendirilmiştir (33). Wnt, bir G-protein-kenetli reseptör olan “frizzled” reseptörlere bağlanır ve glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β)'nın inaktivasyonuna bağlı olarak β -katenin birikimine neden olur. Biriken β -katenin, lenfoid arttırıcı bağlama faktörü-1/T hücre faktörü (LEF-1/TCF) transkripsiyon faktörü ile bir kompleks şeklinde melanositlerin çekirdeğine taşınır. Nükleer β -katenin seviyesindeki artış, melanogenezi uyararak MITF ekspresyonunun artışıyla sonuçlanır (23,34).

Adrenerjik Sinyal Yolağı

Epinefrin (adrenalin) ve norepinefrin (noradrenalin), melanin biyosentezinde öncü molekül olan ve insan epidermal keratinositleri tarafından üretilen L-DOPA'dan sentezlenen katekolaminlerdir. Melanositlerde fosfolipaz C (PLC)'ye bağlı α 1 adrenerjik reseptörler eksprese edilir. Epinefrin ve norepinefrinin, keratinositlere komşu olan melanositlerdeki adrenerjik reseptörlere bağlanmasıyla fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP2) hidrolize olur ve bunun sonucunda inositol-trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşur. İnositol-trifosfat (IP3), Ca⁺²'nin hücre içi konsantrasyonunu arttırır ve diaçilgliserol (DAG), protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonunu indükler. Bu sayede tirozinaz gibi melanogenezde rol oynayan proteinler aktive edilir (2,34).

Opsinlerin Melanogenezdeki Rolü

Opsinler, ilk olarak gözlerde tanımlanan, ışığa duyarlı G-protein-kenetli reseptörlerdir. Göz dışında epidermiste de buldukları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (35). OPN1-SW, OPN2, OPN3, OPN4 ve OPN5, görünür ışığın daha kısa dalga boylarında bir absorpsiyon spektrumuna sahip olan reseptörlerdir ve bazılarının keratinositlerde ve melanositlerde mRNA düzeyinde eksprese edildiği keşfedilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla koyu ten rengine sahip insanlarda UV ışığına maruziyet dışında mavi ışığa maruziyete bağlı olarak da hiperpigmentasyon geliştiği belirlenmiştir. Bu çalışmalardan birinde normal insan melanositlerinin yüzeyindeki ensefalopsin veya panopsin (GPCR OPN3) reseptörünün 415 nm dalga boyunda mavi-mor ışıkla uyarılmasının ardından, hücre içi Ca^{2+} 'nin arttığı ve kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz II (CAMKII), CREB, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) ve p38 MAPK yollarının aktivasyonu sonucunda, MITF aktivasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir. MITF aktivasyonuna bağlı TYR ve DCT'deki artış melanin pigmentinin üretiminin artmasıyla sonuçlanır (2,36).

Tirozin Kinaz Aktivitesine Sahip Reseptörleri İçeren Sinyal Yolakları

Kök Hücre Faktörü (SCF)/KIT Sinyal Yolağı

Kök hücre faktörü (SCF veya KIT-ligandı), insan keratinositleri ve fibroblastları tarafından salgılanan keratinosit kaynaklı bir büyüme faktörüdür. SCF, tirozin-protein kinaz Kit reseptörünün (KIT, CD117) spesifik ligandıdır ve reseptörün dimerizasyonunu ve otofosforilasyonunu indükleyerek aktivasyonunu sağlar. Fosforilasyon sonucunda Shc ve Grb2 gibi adaptör proteinler ve bir guanin nükleotid değişim faktörü olan SOS proteinler aracılığıyla fosfatidilinositol 3'-kinaz ve Ras-mitojenle aktive olan protein kinaz (Ras-MAPK) aktivasyonu gibi farklı basamaklardan oluşan bir dizi reaksiyon katalizlenir. Birbirinden farklı bu reaksiyon basamakları melanositlerin hayatta kalması ve melanin biyosentezi için gerekli olan tirozinaz enziminin aktivasyonunu sağlar (37–39).

Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) Sinyal Yolağı

Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), melanosit proliferasyonunda ve melanin sentezinde rol oynayan bir büyüme faktörüdür. bFGF melanositler tarafından eksprese edilmez. UV ışınlarına maruziyetle birlikte keratinositler tarafından salgılanır ve melanositlerde yer alan reseptörlerine (FGFR) bağlanarak MAPK yolağının aktivasyonunu ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörünün (STAT3) fosforilasyonunu sağlar. Bu aktivasyon ve fosforilasyon sonucunda eşleştirilmiş kutu 3 [Paired Box 3 (PAX3)] isimli transkripsiyon faktörünün ekspresyonu indüklenir. PAX3, MITF ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (12,40).

Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) Sinyal Yolağı

Hepatosit büyüme faktörü (HGF), insan keratinositleri tarafından üretilen ve salgılanan bir büyüme faktörüdür. c-Met, melanositler gibi çeşitli hücrelerin yüzeylerinde eksprese edilen bir reseptör tirozin kinazdır. HGF, c-Met'in ligandıdır ve ligandın reseptöre bağlanması embriyogenez ve yara iyileşmesine aracılık eden bir dizi hücre içi sinyal yolağının aktive olmasını sağlar. Melanogenezde ise MAPK sinyal yolağı aktive olur ve MITF ekspresyonunun artmasıyla melanosit proliferasyonu artar (2,41).

Nöregulin Sinyal Yolağı

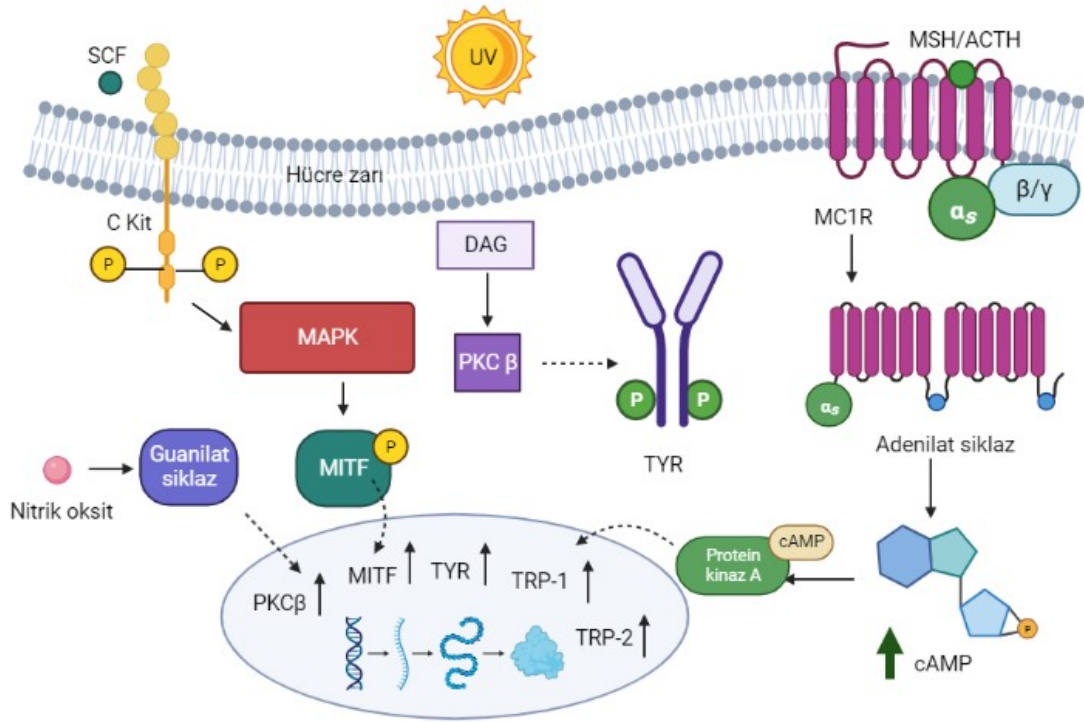
Koyu ten rengine sahip (Fitzpatrick cilt tipi VI) insanlarda fibroblastlar tarafından salgılanan bir faktör olan nöregulin 1'in (NRG1), yeniden yapılandırılmış insan deri modelinde insan melanositlerinde pigment sentezini arttırdığı belirlenmiştir. NRG1, sınıf I reseptör tirozin kinaz olan ErbB reseptörlerine bağlanır. Ligand-reseptör bağlanmasıyla aktive olan fosfatidilinositol-3-kinaz ve MAPK yolağı aracılığıyla insan melanositlerinde MITF ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (2,42).

Kemik Morfogenetik Protein (BMP) Sinyal Yolağı

Kemik morfogenetik proteinleri (BMP), embriyonik gelişim ve postnatal yaşam sırasında birçok farklı hücre ve dokuda çeşitli biyolojik cevapları düzenleyen dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesinin üyeleridir. BMP biyolojik etkilerini, iki tip serin/treonin kinaz BMP reseptörüne bağlanarak gösterir. Reseptörün aktivasyonu fosforilasyonu ve Smad1, Smad5 ve Smad8 gibi hücre içi sinyal moleküllerinin hücre çekirdeğine translokasyonunu sağlar (43). Bunun dışında BMP'nin biyolojik etkilerine MAPK yolağının aktivasyonu aracılık eder. TGF- β süper familyasının üyeleri olmalarına rağmen farklı BMP moleküllerinin ayrıntılı etki mekanizmaları nedeniyle melanogenez açısından farklılık gösterdiği bilinmektedir (44).

BMP-6'nın hem tirozinaz ekspresyonunu ve aktivitesini arttırdığı hem de MAPK yolağı veya kanonik BMP/Smad yolağının aktivasyonu aracılığıyla melanositlerden keratinositlere melanozom transferini artırarak melanogenez uyardığı gösterilmiştir (2).

BMP-4'ün ise, MITF'nü MAPK/ERK'ye bağlı sinyal yolağı aracılığıyla geçici olarak fosforile ettiği gösterilmiştir. Bu fosforilasyon MITF'nün transkripsiyonel aktivitesini artırarak melanogenez akut olarak indükleyebilmektedir, ancak BMP-4 tarafından fosforile edilmiş MITF'nün proteozom aracılığıyla degradasyona uğramasıyla, melanogenezde rol oynayan protein seviyelerinde genel bir azalma olduğu belirlenmiştir (44,45). Melanogenezde rol oynayan sinyal yolağları Şekil 2.4'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.4. Melanogenezde rol oynayan sinyal yolları

2.3. Melazma

Pigment bozuklukları edinilmiş, konjenital, hipopigmenter, hiperpigmenter veya karışık tip pigmenter bozukluklar olarak farklı gruplara ayrılabilir. Pigment bozuklukları, hastanın yaşam kalitesini oldukça etkilediğinden dermatologlara en yaygın başvuru nedenleri arasında sayılmaktadır. Melazma, epidermis tabakasında melanin pigmentini üreten melanosit hücrelerinin sayısının ve aktivitesinin artmasına bağlı olarak özellikle de yüz gibi vücudun güneş ışınlarına daha fazla maruz kaldığı bölgelerdeki epidermis tabakasında ve/veya dermis tabakasında düzensiz desenlere sahip kahverengi veya gri-kahverengi melanin pigmentinin birikimiyle sonuçlanan, kronik, edinilmiş bir bozukluktur. Yunanca siyah anlamına gelen “*melas*” kelimesinden köken alır (5). Yunanca yeşil anlamına gelen “*chloazein*” kelimesinden köken alan ve “gebelik maskesi” olarak da bilinen kloazma, melazmanın eş anlamlısı olarak kullanılmaktadır. Ancak ciltteki pigmentasyon görünümü hiçbir zaman yeşil renkte olmadığından, hiperpigmentasyonu tanımlamak için melazma terimi daha yaygın olarak kullanılır (6). Melazma tanısı klinik olarak konulmaktadır; nadiren de olsa bazı durumlarda biyopsi gerekebilir. Melazmanın şiddeti, melazma alanı ve

şiddet indeksi (MASI) skoru, modifiye MASI (mMASI) skoru, kolorimetri ve meksametri kullanılarak ölçülebilmektedir. Melasma yaşam kalitesi skalası (MelasQoL) tedaviyi yönlendirmek ve tedaviyi takiben iyileşmeyi izlemek için kullanılabilir (46,47).

2.3.1. Epidemiyoloji

Melasma oldukça sık gözlenen bir hastalık olmasına rağmen demografik ve klinik özellikleri ile ilişkisini inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur (48).

Cilt pigmentasyon fenotipini belirlemek için en yaygın kullanılan değerlendirme yaklaşımı Fitzpatrick ölçeği ile değerlendirmedir. Bu ölçek, UV ışınlarına maruziyeti takiben gelişen eritem ve kazanılmış pigmentasyonu derecelendirerek cildi altı fototipe (I-VI) ayırır (2). Melazmanın dünyada tüm popülasyonlarda görülebileceği bilinmekle birlikte, yapılan epidemiyolojik çalışmalar UV ışınlarına daha fazla maruz kalan Fitzpatrick IV-VI cilt fototipine sahip Doğu Asyalılar (Japonlar, Koreliler ve Çinliler), Hintliler, Pakistanlılar, Orta Doğulular, Akdeniz-Afrikalılar ve Hispanikler arasında daha yaygın görüldüğünü göstermektedir (48–50).

2.3.2. Etiyoloji

Melasma etiyojisinde genetik yatkınlık, UV ışınlarına maruziyet, hormonlar, oral kontraseptifler, östrojen-progesteron tedavileri, gebelik, tiroit fonksiyon bozuklukları, psikosomatik bozukluklar, kozmetikler, fotoduyarlılığa neden olan ilaçlar gibi çok sayıda faktör rol oynamaktadır (48,51).

UV Işınları

Melanin pigmenti, UV ışınlarının emilimini ve saçılmasını sağlayarak UV radyasyondan kaynaklanan DNA hasarına karşı koruma sağlamaktadır. Ancak, UV ışınlarının belirli dalga boylarının insanlarda cilt yaşlanması, pigmentasyon ve cilt kanserine neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir (52). En zararlı olarak kabul

edilen dalga boyları, UV-A olarak adlandırılan 320-400 nm ve UV-B olarak adlandırılan 290-320 nm arasındadır. UV spektrumu ayrıca UV-C ve diğer alt bölümleri de içerir. 200–280 nm dalga boyları arasında kalan UV-C ışınları atmosferik oksijen tarafından filtrelendiği ve ozon tabakası tarafından emildiği için dünyanın yüzeyine ulaşmaz. Dünya yüzeyine ulaşan UV radyasyonunun %90-95'i UV-A'dır ve geri kalan kısmı UV-B ışınları oluşturur. UV-A ve UV-B'nin farklı dalga boyları cilt üzerinde farklı etkilere sahiptir. Daha kısa dalga boylu olan UV-B ışınlarının çoğu atmosferik ozon tabakası, bulutlar, hava kirliliği ve cam yüzeyler tarafından saçılır; öte yandan, UV-B ışınları insanlarda güneş yanığının ana nedenidir. Daha uzun dalga boyuna sahip UV-A ışınları ise derinin daha alt tabakalarına nüfuz eder (53,54).

UV ışınları melanogenezin düzenlenmesinde en önemli dış faktördür. "Bronzlaşma" olarak bilinen indüklenmiş veya kazanılmış pigmentasyon için ana uyarıcıdır. Genetik faktörlere bağlı olan ve koyu tenli ve saçlı kişilerde daha belirgin olan iki tip indüklenmiş pigmentasyon vardır: ani pigmentasyon ve gecikmiş pigmentasyon. UV ışınlarına maruz kaldıktan 5-10 dakika sonra ortaya çıkan, dakikalar veya günler sonra kaybolan ani pigmentasyon, büyük ölçüde UV-A ışınlarına bağlıdır. Melanin sentezinin artması bağlı olarak değil, önceden var olan melaninin oksidasyonuna ve melanozomların epidermal üst katmanlara yeniden dağılımına bağlı olarak gerçekleşir. UV ışınlarına maruz kaldıktan 3-4 gün sonra ortaya çıkan gecikmiş pigmentasyon ise haftalar içinde kaybolur. UV-A ve esas olarak UV-B ışınlarına bağlı olarak gelişir. Epidermal melanin, özellikle de fotokoruma sağlayan eumelanin sentezinin artmasından kaynaklanır (26,54).

UV ışınları direkt olarak veya dolaylı yoldan keratinositlerden veya fibroblastlardan adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve melanosit stimüle edici hormon (MSH) gibi proopiomelanokortin (POMC) kaynaklı peptitler, kök hücre faktörü (SCF), sinir büyüme faktörü (NGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), EDN1 veya mast hücrelerinde sentezlenen histamin gibi melanogenezini indükleyen faktörlerin salınmasını sağlar. Bu faktörler cAMP, nitrik oksit (NO) ve protein kinaz C (PKC) gibi sinyal iletim yollarının aktivasyonu aracılığıyla melanin üretimini tetikler (6,12,55).

İlaçlar

Hiperpigmentasyon, dış görünüşü ve yaşam kalitesini etkilediği ve tedaviye uyumu etkileyebileceği için hasta üzerinde önemli etkileri olabilen yaygın bir dermatolojik problemdir. Yapılan çalışmalar hiperpigmentasyona neden olabilecek faktörler arasında bazı ilaçların da olabileceğini göstermiştir. Hiperpigmentasyonla ilişkili olabileceği düşünülen ilaçlar arasında steroidal olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID), antihipertansif ajanlar, antibiyotikler, psikoaktif ajanlar, amiodaron ve mukolitikler yer almaktadır (30).

Tetrasiklin kaynaklı hiperpigmentasyon esas olarak minosiklin ve daha az sıklıkla da doksisisiklin veya diğer birinci nesil tetrasiklinlerden kaynaklanmaktadır. Minosikline bağlı hiperpigmentasyon, özellikle uzun süreli tedavi gören hastaların % 15' inde ortaya çıkabilir. Minosiklin tarafından indüklenen üç tip hiperpigmentasyon bildirilmiştir. Tip 1 hiperpigmentasyon önceki inflamasyon veya yara izi bölgesinde görülen mavi-siyah hiperpigmentasyondur ve minosiklinin demir şelatları tarafından üretilen pigment granülleriyle ilişkilendirilmektedir. Tip 2 hiperpigmentasyon cildi, özellikle de bacakları etkileyen gri-mavi hiperpigmentasyondur ve derideki minosiklin metabolitlerine bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Tip 3 hiperpigmentasyon ise güneşe maruz kalan bölgelerdeki kirli cilt sendromu olarak tanımlanmaktadır ve mikroskopik çalışmalar sonucunda epidermis ve dermisin makrofajlarında daha yüksek miktarlarda melanin bulunduğu belirlenmiştir (56).

Olgu raporu sayısı çok az da olsa antihipertansif ilaçlardan telmisartan, kaptopril, diltiazem, amlodipin ve lerkanidipinin de hiperpigmentasyona neden olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (30).

Antikonvülsanlar, yüksek oranda advers ilaç reaksiyonu oluştururlar. Bunlardan karbamazepin, lamotrijin ve fenitoin ile ilişkili hiperpigmentasyon görüldüğü bildirilmiştir (30).

Psikoaktif ilaçlardan fenotiyazinlerin veya trisiklik antidepresanların uzun süreli kullanımının genellikle güneşe maruz kalan bölgelerde hiperpigmentasyona

neden olabileceği bildirilmektedir. En sık kullanılan ilaçlardan biri olan klorpromazin güneşe maruz kalan bölgelerde, özellikle yüzde menekşe veya metalik gri mor pigmentasyona neden olur. Yapısal olarak fenotiyazinlerle ilişkili olan trisiklik antidepresanlar, klorpromazinden çok daha az sıklıkla hiperpigmentasyona neden olabilir. Bu gruptan özellikle imipramin ve amitriptilin ile ilişkili hiperpigmentasyon vakaları bildirilmiştir (30).

Patofizyolojik mekanizması tam olarak açıklanmasa da NSAID'lerin hapten gibi davranarak melanositlere yönelik spesifik bir sitotoksik reaksiyon başlatabileceği ileri sürülmektedir. Bu advers reaksiyonla en sık ilişkilendirilen ilaçlar parasetamol, salisilatlar, oksikam türevleri ve ibuprofendir (30).

Kozmetikler

Bergamot yağı, furanokumarin bileşikleri, mineral yağlar, petrolatum, balmumu, bazı boyalar, parafenilendiamin ve parfüm bileşenlerini ve bunların fotoaktif artıklarını içeren kozmetik ürünlerin UV ışınlarına maruziyet sonucunda sinerjistik olarak fototoksikite reaksiyonlarıyla melazmaya neden olabileceği belirtilmektedir (57).

Hormonal Değişiklikler

Pigmentasyon hücrel hormonlar tarafından da kontrol edilir. Gebelik, hormon replasman tedavisi ve oral kontraseptif kullanımı gibi nedenlerle meydana gelen östrojen ve progesteron seviyelerindeki değişiklikler melanosit stimüle edici hormon (MSH) salınımını arttırabilir. İnsan melanositlerinde klasik östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) bulunmamaktadır. Östrojen, G-protein-kenetli östrojen reseptörü (GPER) aracılığıyla tirozinaz ekspresyonunu indükleyerek melanogenezi tetiklerken progesteron, adipoQ reseptörü 7 (PAQR7) ve progestin reseptörü aracılığıyla melanin üretimini inhibe etmektedir. (58).

Çevre Kirliliği

Literatürde tarım zararlılarıyla mücadelede kullanılan fungusit, herbisit ve pestisit üretimi ve endüstriyel olarak üretilen çevreye yüksek derecede toksik kirleticilerin cilt kanseri ve klorakne gibi dermal hastalıklarla ilişkili olabileceğine dair çalışmalar yer almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kirliliğin melazma gelişimi için de olası bir risk faktörü olduğunu öne sürmektedir. Dioksinler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) gibi kirleticilerin ksenobiyotik metabolizmasında yer alan aril hidrokarbon reseptörü (AHR) sinyal yolunun endojen aktivatörlerini taklit ettiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksine (TCDD) maruz kalan normal insan melanositlerinde AHR sinyal yolunun aktive olduğu ve AHR'ye bağlı tirozinaz aktivitesinin indüklenmesi sonucunda melanin seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç, AHR'nin melanojenik etkisinin, promotör bölgesinde AHR'ye yanıt veren elementler içeren tirozinaz geninin transkripsiyonel düzenlemesinden kaynaklandığını düşündürmektedir (2).

AHR sinyal yolağı dışında PAH'ların dermal absorpsiyonu sonucunda vücutta kinon bileşiklerine dönüştüğü, bu bileşiklerin reaktif oksijen türleri (ROS)'un oluşumuna yol açarak metalloproteinaz seviyelerinin yükselmesini tetiklediği ve bu yolla hiperpigmentasyona yol açtığı tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, aynı zamanda dünyanın en kirli coğrafi bölgeleri olan Hindistan, Çin, Güneydoğu Asya ve ABD'de yaşayan Fitzpatrick cilt tipi III-VI olan kişilerde melazma insidansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (59).

2.3.3. Patogenez

Melanositler, keratinositler, dermal fibroblastlar ve bağışıklık hücrelerinden salınan bir dizi endojen molekül, melanogenezi parakrin ve otokrin olarak modüle eder. Fibroblastlardan veya keratinositlerden salınan ACTH ve MSH gibi POMC kaynaklı peptitler, SCF, ET-1, HGF, KGF, NGF, bFGF ve PGE2 gibi inflamatuvar mediyatörler ve NO melanogenezi önemli ölçüde uyarır. Tüm bu uyarıların, GPCR, tirozin kinaz reseptörleri (SCF/KIT sinyal yolağı, bFGF reseptörleri ve HGF

reseptörü vb.), adrenerjik ve nöregulin gibi farklı sinyal yollarının aktivasyonu aracılığıyla melanogenezi indüklediği bilinmektedir. Bu yolların içerisinde SCF/KIT yolağı melanogenezdeki ana sinyal yolağı olarak kabul edilmektedir (2,6,12,29,55,60).

Melanositlerin gelişimini, hayatta kalmasını, proliferasyonunu ve melanin sentezinde yer alan adımları kontrol ettiği için melanogenezde baskın transkripsiyon faktörü olan MITF ekspresyonunun ve aktivitesinin bahsi geçen sinyal yollarının çoğu aracılığıyla transkripsiyonel olarak düzenlendiği bilinmektedir. MITF TYR, TRP-1 ve TRP-2 dahil olmak üzere melanogenezde rol oynayan enzimlerin transkripsiyonunu indükler. Bunun dışında, melanozom olgunlaşmasını, trafiğini ve keratinositlere dağılımını kontrol etmek için gerekli olanlar da dahil olmak üzere, melanogenezde yer alan diğer birçok genin düzenlenmesinde görev alır. MITF ekspresyonu, siklik adenosin monofosfat (cAMP), CREB, PAX3 isimli transkripsiyon faktörü, Wnt/ β -katenin, LEF-1 gibi MITF promotörünü bağlayan birkaç transkripsiyonel faktör tarafından düzenlenir (61).

MITF aktivitesi transkripsiyonel seviye dışında transkripsiyon sonrası seviyede de fosforilasyon ile düzenlenir. MITF'nün mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK-3 β) gibi birkaç kinaz tarafından fosforilasyonu sonucunda da TYR, TRP-1 ve TRP-2 gibi melanogenezde rol oynayan enzimlerin transkripsiyonu, dolayısıyla melanin pigmentinin üretimi artar (29,62).

2.3.4. Tedavi

Melazma tedavisi etiyolojisinin çok faktörlü olması nedeniyle zor ve karmaşıktır. Topikal olarak uygulanan tedavi seçenekleri geçici olarak iyileşmeyi sağlayabilir, ancak hastalık çoğunlukla tekrarlar. Hastalığın ciddiyetine ve klinik alt tipine göre hasta odaklı tedavi seçeneklerinin seçilmesi tedavinin başarısında önem taşımaktadır (5,6). Hastaya en uygun ve en etkili tedavi yönteminin seçilebilmesi için melazma şiddetinin tespit edilmesi gerekmektedir. Tedavide kullanılan ajanlar melanin üretiminin baskılanması, melanosit aktivitesinin baskılanması, melaninin

deriden uzaklaştırılması ve melaninin saçılması olmak üzere dört temel mekanizma üzerinden gerçekleştirilir (3,63,64).

Melanosit Aktivitesinin Baskılanması

UV ışınları doğrudan veya dolaylı yoldan fibroblastlardan veya keratinositlerden melanin üretimini tetikleyen mediyatörlerin salınmasına neden olarak melanin sentezini indükler (3).

Melazmanın tekrar etmesinin veya şiddetinin artmasının önlenmesinde güneşten korunma önem taşımaktadır. Bu nedenle hiperpigmentasyonu olan hastaların olabildiğince gölge yerlerde kalmaları ve özellikle güneş ışınlarının dik geldiği saatler olan 10.00-15.00 arasında dışarıda olunacaksa güneş ışınlarına maruziyetin önlenmesi için geniş kenarlı şapkalar, güneş gözlükleri ve uzun kollu giysiler gibi koruyucu kıyafet/aksesuar ve güneş koruyucu kullanmaları tavsiye edilmektedir (51,65,66).

Melanin Sentezinin Baskılanması

Hidrokinon, azelaik asit, retinoidler, topikal kortikosteroidler, L-askorbik asit, arbutin, kojik asit ve rucinol gibi bileşenler tirozinaz enziminin yarışmalı olarak inhibisyonu, melanositlerde DNA ve RNA sentezini inhibisyonu sonucu melanozomların ve melanositlerin yıkılması, tirozinaz enziminin transkripsiyonunun engellenmesi, melanositlerden keratinositlere pigment taşınmasının inhibisyonu, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörün (GM-CSF) ve EDN1 salgılanmasının engellenmesi ve tirozinazın yapısında yer alan bakır ile etkileşerek tirozinazın inhibisyonu gibi farklı mekanizmalarla melanin sentezinin baskılanmasını sağlar (3,7,67).

Melaninin Uzaklaştırılması

Alfa hidroksi asitler olarak bilinen glikolik asit, trikloroasetik asit, laktik asit gibi asitlerin ve salisilik asit gibi beta hidroksi asitlerin kimyasal soyucu etki

göstererek hiperpigmentasyon tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Tedavide hangi kimyasal soyucu ajanın kullanılacağı, uygulanacağı konsantrasyon, uygulama süresi ve uygulama sıklığı tedavi başarısını etkileyen unsurlardır. Kimyasal soyucu ajanlar hiperpigmentasyon tedavisinde nadiren tek başlarına yeterli olur (7,68–70).

Melanin Granüllerinin Saçılması

Lazer ışınları ve lazer dışında kalan ışık tedavileri dermis tabakasının üstünde yer alan melanin granüllerinin parçalanmasını sağlar. Melanin pigmenti, ışığı 600-1100 nm arasında değişen oldukça geniş bir spektrum aralığında absorbe eder. Belirtilen dalga boylarını kullanan cihazlar arasında Q anahtarlı (QS) lazerler, yoğun atımlı ışık (IPL) ve ablatif olmayan atımlı lazerler yer almaktadır (51,71).

Melazma tedavisinde kullanılan ajanlar, etki mekanizmaları ve advers etkileri Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Melazma tedavi seçenekleri, etki mekanizmaları ve advers etkileri.

Etkin Madde	Etki Mekanizması	Advers Etkileri	Kaynaklar
Adapalen	Tirozinaz enzim transkripsiyonunun engellenmesi Melanositlerde üretilen melaninin keratinositlere taşınmasının inhibisyonu	Kuruluk Eritem Yanma hissi	(5,72)
Arbutin ve Deoksiarbutin	Tirozinaz aktivitesinde azalma Melanozom olgunlaşmasının inhibe edilmesi	Postenflamatuvar hiperpigmentasyon	(73,74)
Azelaik asit	Mitokondriyel oksidoredüktaz inhibisyonu, Tirozinaz enziminin inhibisyonu Melanosit inhibisyonu	Kızarıklık Kaşınma Yanma hissi	(75,76)
Flutamid	Antiandrojenik ve antiöstrojenik etki α MSH ve cAMP seviyelerinde azalma	-	(77)
Glikolik asit	Kimyasal olarak soyma Tirozinaz inhibisyonu	Kimyasal yanık Kızarıklık Postenflamatuvar hiperpigmentasyon	(78–81)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Tirozinaz inhibisyonu Antienflamatuvar	Tahriş	(82–84)
HQ	Tirozinaz inhibisyonu Peroksidaz inhibisyonu Melanosit inhibisyonu Melanosit hücre membrane yıkımı	Postinflamatuvar hiperpigmentasyon Eksojen okronoz İrritasyon Eritem	(7,85–87)
Kojik asit	Tirozinazın yapısında bulunan bakır ile şelasyon	Tahriş Temas dermatiti	(88,89)
Kortikosteroidler	ET-1 ve GM-CSF inhibisyonu Antienflamatuvar	Telanjiektazi Akne Epidermal atrofi	(90,91)
Laktik asit	Kimyasal soyma	-	(7)
Metimazol	Peroksidaz inhibisyonu Melanosit inhibisyonu	Sistemik absorpsiyon gözlenmemiştir.	(92,93)
Nikotinamid	Melanozom transfer inhibisyonu Melanosit inhibisyonu	İrritasyon	(94)
Proton pompa inhibitörleri	ATP4A ve ATP7A blokajı Tirozinaz degradasyonunun artışı	-	(95,96)
Retinoidler	Tirozinaz transkripsiyonunun inhibisyonu Melanositlerdeki melanin pigmentinin keratinositlere taşınmasının inhibisyonu	Retinoid kaynaklı dermatit	(97,98)
Rusinol	TRP-1 ve tirozinaz enzimi inhibisyonu	Kızarıklık Kuruluk Pul pul dökülme	(98–100)
Salisilik asit	Kimyasal soyma		(101,102)
Sisteamin	Tirozinaz inhibisyonu Peroksidaz inhibisyonu Demir ve bakır şelasyonu Hücre içi glutatyon seviyesinde artış	İrritasyon	(103,104)
Thiamidol	Tirozinaz inhibisyonu	-	(105,106)
Traneksamik asit (Oral, topikal, intradermal)	VEGF aracılı angiogenez inhibisyonu, Plazmin inhibisyonu, Tirozinaz inhibisyonu Mast hücre downregülasyonu	Menstrüel düzensizlikler, GIS şikayetleri, cilt iritasyonu, baş ağrısı, tromboembolik komplikasyonlar	(98,107–109)
Trikloroasetik asit	Keratinosit turnoverının artışı	İrritasyon	(110,111)
Askorbik Asit	Tirozinazın yapısında bulunan bakır ile etkileşim UV ışınlarına karşı koruyucu	Kuruluk, kızarıklık, batma hissi	(7,10,112–115)

HQ: hidrokinon

Mevcut çalışmalardan elde edilen sonuçlar melazma tedavisi için en etkili tedavi seçeneğinin, HQ'nun özellikle bir steroid ve retinoid ile birlikte topikal olarak uygulanması olduğunu göstermektedir (5). Ancak son yıllarda HQ toksisitesinin araştırılması için insanlarda gerçekleştirilen kısa süreli, tek doz, in vivo çalışmalar sonucunda HQ içeren kremlerin uygulanmasının ardından HQ'nun cilt tarafından hızlı bir şekilde (%45 oranında) emildiği ve uygulamadan 1 saat sonra %30 oranında HQ'nun hızlı bir şekilde kan dolaşımına geçtiği belirlenmiştir. Sistemik dolaşıma geçen HQ'nun kanda farklı oranlarda (% 35 serbest HQ, %35 proteine geri dönüşümlü olarak bağlanan HQ ve %10 proteine geri dönüşümsüz bağlanan HQ) bulunduğu belirlenmiştir. HQ'nun önemli bir bölümünün karaciğerde sülfat ve glukuronid konjugasyonuna uğradığı ve suda çözünürlüğü yüksek olan sülfat ve glukuronit metabolitlerinin böbrekler aracılığıyla vücuttan atıldığı tespit edilmiştir. İnsanlarda, HQ'nun küçük bir bölümünün hepatik metabolizasyona uğramadığı ve küçük bir bölümünün de parabenzokinona dönüştüğü saptanmıştır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, metabolize edilmemiş HQ'nun ve p-benzokinonun gama glutamil transpeptidaz aracılığıyla glutatyon konjugatına dönüştüğünü ve bu konjugatlardan 2,3,5-tris (glutatyon-S-il) isimli konjugatın mitokondrilerde fonksiyon bozukluğuna neden olan kuvvetli bir nefrotoksin olduğunu göstermiştir (116).

Hidrokinonun dermal olarak uygulandığında karaciğerde ilk geçiş etkisine uğradığı, bu nedenle metabolize edilmeden hem serbest hem de proteine bağlı HQ formlarının bütün vücuda dağılarak kemik iliğine ulaştığında miyeloperoksidaz aktivitesinin artması nedeniyle p-benzokinona dönüştüğü belirlenmiştir. Hayvan deneylerinde p-benzokinon metabolitinin, DNA ile kovalent bağ oluşturduğu, ROS artışına neden olduğu ve tek iplikli DNA kırıkları, DNA/RNA sentezinin inhibisyonu, mikrotübüler polimerizasyonun engellenmesi, DNA katım ürünlerinin oluşumu gibi farklı mekanizmalarla potansiyel karsinojenik risk oluşturduğu belirlenmiştir. HQ içeren preparatların topikal olarak uygulanmasını takiben kanser geliştiğini gösteren bir çalışma literatürde henüz yer almasa da doktorların, şimdiye kadar göz ardı edilen bu potansiyel risklerinin farkında olarak tedavi rejimini düzenlemesi önem taşımaktadır (116,117). HQ ve metabolitlerinin toksisiteleriyle

ilgili çalışmaların artmasıyla birlikte melazma tedavisinde en sık kullanılan bileşen olan HQ ile ilgili kaygılar gündeme geldiğinden dünyadaki birçok ülkede %2 HQ etkin maddesine sahip farmasötik preparatlar reçete ile satılmaktadır (60,116). Ayrıca kalıcı depigmentasyon ve eksojen okronoz gibi olası advers etkiler nedeniyle Avrupa Birliği Tüketici Güvenliği Bilimsel Komitesi (SCCS) tarafından 01.01.2001 tarihinden sonra HQ bileşeninin kozmetik formülasyonlarında kullanılması yasaklanmıştır (60). Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından 25823 sayılı Resmî Gazete’de 23.05.2005 tarihinde yayımlanan Kozmetik Yönetmeliği, AB Kozmetik Mevzuatı’nın 76/768/EEC sayılı Konsey Direktifi ile 96/335/EC sayılı Komisyon Kararıyla uyumlu bir şekilde hazırlandığından Türkiye’de de HQ içeren ürünler kozmetik ürün kapsamında değerlendirilmemektedir (118,119).

Mevcut çok sayıda tedavi yöntemine rağmen tedavilerin güvenliliği ve etkinliklerindeki sınırlamalar nedeniyle tüm hastalar için etkili olan tek bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. En etkili tedavi seçeneği olarak kabul edilen HQ kullanımına bağlı olarak görülen advers etkiler ve uzun süreli HQ kullanımının güvenliliğiyle ilgili kaygılar nedeniyle, bu tedavi seçeneğine alternatif olabilecek yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması gündeme gelmiştir.

2.4. MNT-1 Hücre Hattı

MNT-1 hücre hattı lenf noduna metastaz yapmış insan melanoma hücreleridir. 1991 yılında Philadelphia Çocuk Hastanesi’ne hücreyi ilk temin eden araştırmacı Zev Sunleaf’tır. Yapıları fibroblastlara benzemekte olup, adherent hücrelerdir. Melanozom özellikleri, melanozom biyogenezi, insanlarda pigmentasyon üzerindeki etkiler ve membran trafiği çalışmaları için kullanışlı bir hücre hattıdır (120).

Morfolojik özelliklere dayanarak, melanozomların biyogenez yolları dört farklı evreye (I, II, III ve IV) ayrılmaktadır. Evre I melanozomlar, tanımlanmamış bir iç matrikse sahip lizozom benzeri küresel organellerdir. Evre II melanozomlar ise tipik olarak uzundur ve ayırt edici bir fibriler matriks içerir. Evre I ve evre II melanozomlar, melanin sentezi henüz başlamadığı için erken melanozomlar veya

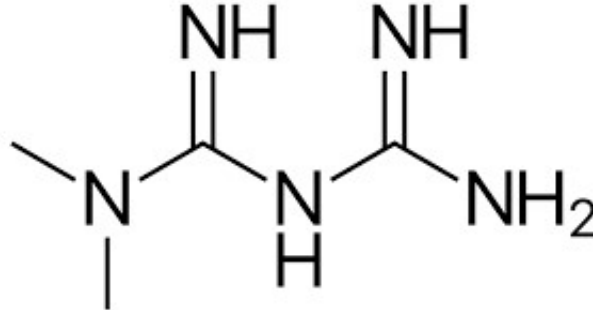
premelanozomlar olarak da bilinir. Bunun aksine, evre III melanozomlar, fibriler matriks üzerinde siyah elektron yoğun pigmentin birikmesiyle sonuçlanan melaninin aktif sentezi ile karakterize edilir. Son olarak, evre IV melanozomlar tamamen olgundur ve tamamen melaninle dolu oldukları için iç yapıları çok az görülebilmektedir. MNT-1 hücrelerinin farklı evrelerdeki melanozomlara sahip olması nedeniyle bu hücre hattı melanozom biyogenez yolağının araştırılmasında kullanılabilir (121).

MNT-1 melanoma hücreleri, yalnızca yüksek pigmentasyonun gözlenebilmesi açısından değil, aynı zamanda tenascin C1 (TNC1), tümör nekroze faktör reseptör süperailisi üyesi 12A (TNFRSF12A), doku metalloproteinaz 3 inhibitörü (TIMP3), integrin alfa 6 (ITGA6), Sindekan 2 (SDC2) ve Rasla ilişkili Protein Rab-38 ve Rasla ilişkili Protein Rab27A gibi reseptör aktivite grubundaki genleri de içermesi açısından normal insan melanositlerine çok benzediği için çalışmalarda tercih edilmektedir (122).

2.5. Metformin

Biguanidler, diyabet tedavisinde kullanılan ve guanidinden türetilen sentetik moleküllerdir. Guanidin, tıpta uzun yıllardır kullanılan bir bitki olan *Galega officinalis*'ten elde edilir. Tip 2 diyabet tedavisinde buformin, fenformin ve metformin gibi birçok guanidin türeviden bileşik kullanılmıştır (123). İlk başta metformin (N,N-dimetilbiguanid), insülin duyarlılığı üzerinde daha az etkili olduğu için diğer guanidin türevlerine göre daha az tercih edilmiştir. 1920-1930'lu yıllarda diğer biguanid bileşikleri olan fenformin ve buforminin toksisiteleri ile ilgili çalışmalar ve sonraki yıllarda hem kardiyak mortalite hem de laktik asidoz ile ilişkilendirilmeleri, çoğu ülkede 1970'lerin sonunda kullanımlarının sona ermesine neden olmuştur. 1957'de Fransız kimyager Jean Sterne'in metforminin görünür bir toksisite olmaksızın tip 2 diyabet üzerindeki etkilerini gösterdiği bir çalışma sayesinde metformin 1958 yılında Avrupa'da ve 1995 yılında ABD'de pazarlama izni almıştır (124). Şu anda metformin dünyada en çok reçete edilen antidiyabetik ilaçtır

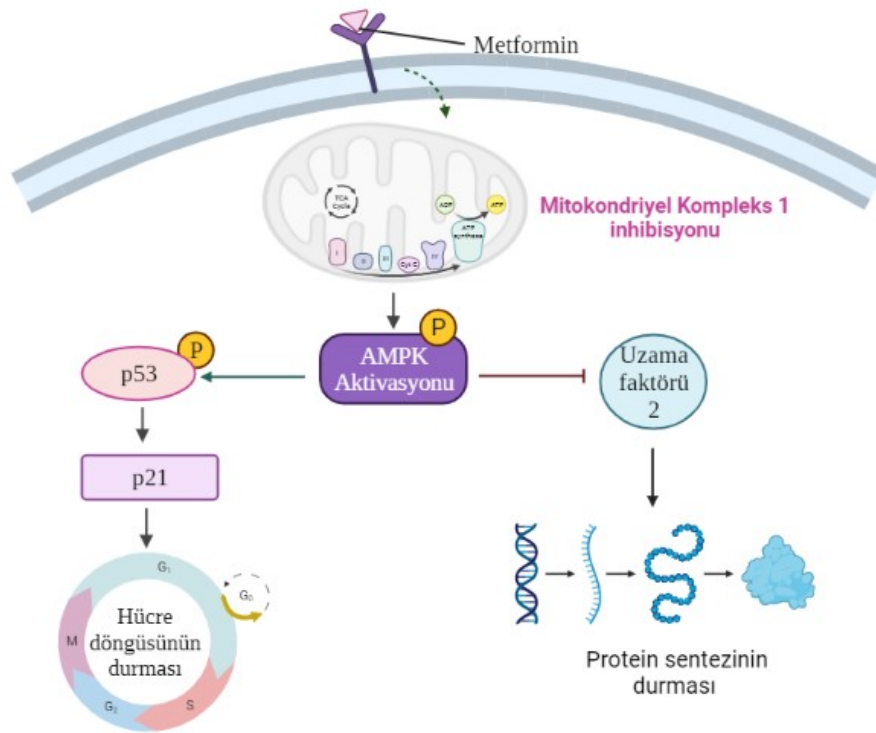
ve 120 milyondan fazla diyabetli hastayı tedavi etmek için kullanılmaktadır (123). Metforminin kimyasal yapısı Şekil 2.5'te yer almaktadır.



Şekil 2.5. Metforminin kimyasal yapısı

Metformin, diyabetik hastalarda hipoglisemiye neden olmadan hiperglisemiye azaltan ve çok iyi tolere edilen bir etkin maddedir. Metforminin başlıca etkileri hepatik glukoneogenezi azaltmak ve iskelet kasları tarafından glukoz emilimini arttırmaktır. Bu etkiler öncelikle metforminin, metabolik kontrol noktası AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonunu gerektiren mitokondri üzerindeki etkisinden kaynaklanmaktadır. AMPK, hücre içindeki enerji dengesinin yeniden sağlanmasında yer alan birçok metabolik yolda önemli bir rol oynayan bir enerji sensörüdür. AMPK aktivasyonu sürdürüldüğünde hücre büyümesi ve proliferasyonu, hücre döngüsü regülasyonu, hücre polaritesi, apoptoz ve otofaji gibi farklı hücresel süreçlerde önemli bir rol oynayabilir (123,125).

Moleküler düzeyde metformin, karaciğerdeki mitokondriyal solunum zincirini inhibe ederek AMPK'nin aktivasyonuna yol açar, yağ metabolizması üzerindeki etkiler yoluyla insülin duyarlılığını artırır ve cAMP seviyesini ve böylece glukoneojenik enzimlerin ekspresyonunu azaltır. Metformin mitokondriyal solunum zincirinde kompleks 1'i inhibe ederek AMPK'yi aktive eder ve bu aktivasyon p21 ekspresyonunu artıran ve hücre döngüsünün durmasına neden olan p53'ün doğrudan fosforile edilerek hücre proliferasyonunun azalmasına neden olur (126). AMPK ayrıca uzama faktörü 2 (EF-2) proteininin inhibisyonu yoluyla protein sentezini de inhibe eder. Metforminin AMPK üzerindeki etkileri Şekil 2.6'da yer almaktadır (127).



Şekil 2.6. Metforminin etki mekanizması

Yakın zamanda yapılan bir çalışma ayrıca, metforminin, kalsiyum akışı salınımı yoluyla mitokondriyal fonksiyonları düzensizleştirdiğini göstermiştir. Bu çalışma metforminin, hücrenin sitoplazmasına kalsiyum salan endoplazmik retikulum (ER) stresini ve mitokondri tarafından daha yüksek kalsiyum emilimini indüklediğini göstermektedir. Bunun da mitokondriyal şişme ile sonuçlandığı belirlenmiştir (128).

Alanyazın incelemesinde metforminin diyabet dışında başka hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceğine dair birçok çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalardan metforminin prostat, meme, akciğer ve cilt kanserleri (melanomalar) dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde kanser hücrelerinin çoğalması ve hücre ölümü üzerinde etkili olabileceğine dair sonuçlar elde edilmiştir (123).

Melanoma ile ilgili yapılan birçok çalışmada metforminin, melanoma hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu engellediği belirlenmiştir. Tomic ve arkadaşları tarafından 2011'de tarafından yapılan çalışmada metforminin melanositler, keratinositler veya fibroblastlar gibi normal hücreler üzerinde toksik

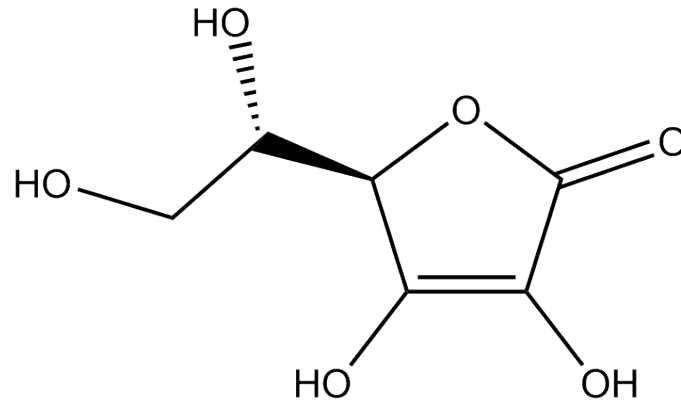
olmadığını gösterilmiştir (129). Miller ve ark. tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada ise metforminin cAMP seviyesini azalttığı ve cAMP'nin melanin sentezi ve cilt pigmentasyonunda çok önemli bir rolü olduğu gösterildiğinden (130), metforminin pigmentasyon üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Metforminin, cAMP'nin birikmesini ve cAMP'ye bağlı protein (CREB) fosforilasyonunun inhibisyonuna neden olarak MITF, tirozinaz, TRP-1 ve TRP-2 gibi melanin sentezinde rol oynayan genlerin ekspresyonunu azalttığı ve bunun da melanositlerde melanin miktarının azalmasıyla sonuçlandığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Ayrıca, diyabet tedavisindeki etki mekanizmasının aksine metforminin antimelanojenik etkisinin AMPK yolundan bağımsız olabileceği belirtilmiştir (125,131).

2.6. Askorbik Asit (C Vitamini)

Askorbik asit, serbest radikallerin oluşumunu veya çoğalmasını engelleyerek veya nötralize ederek antioksidan görevi gören bir bileşendir. Kozmetik ürünler, beşeri tıbbi ürünler ve gıdalar gibi farklı ürün gruplarında kullanılmaktadır (132).

Askorbik asit kemiklerin, dişlerin, diş etlerinin, ligamentlerin ve kan damarlarının sağlıklı gelişimi için hayati öneme sahip bir vitamindir ve vücutta bazı enzimlerin stimülasyonu, kolajen biyosentezi, hormonal aktivasyon, antioksidan, histaminin detoksifikasyonu, lökositlerin fagositik işlevleri ve prolin hidrosilasyonu gibi önemli metabolik işlevlerde rol oynar (133). Askorbik asidin kimyasal yapısı Şekil 2.7'de gösterilmektedir.



Şekil 2.7. L-askorbik asidin kimyasal yapısı.

Askorbik asit, yara iyileşmesi için gerekli olan kolajen biyosentezi sırasında prolil ve lizil kalıntılarının hidroksilasyonu için gereklidir. Dokularda oksidatif hasara karşı korumada etkilidir ve nitrozaminler gibi kanserojenlerin oluşumunu baskılayarak kanser insidansında azalma ile ilişkilendirilmiştir. Askorbik asit tüm bitkiler ve çoğu hayvan tarafından sentezlenir. Askorbik asit sentez yolundaki terminal enzim olan gulonolakton oksidaz geni, insanlarda onu işlevsiz hale getiren mutasyonlara uğradığından insanlarda esansiyel bir vitamindir (134). Bu nedenle insanlar bu vitamini diyetten ve/veya vitamin takviyelerinden alırlar. Sağlıklı yetişkinlerde askorbik asit için minimum günlük gereksinim 40-60 mg'dır (135,136).

C vitamininde, L-askorbik asit ve D-askorbik asit olarak eşit miktarda bulunur. Eşit orandaki bu izomerlerden sadece L-askorbik asit tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır (10). L-askorbik asit, tirozinazın yapısında yer alan bakır ile etkileşir ve tirozinaz enzimini inhibe ederek dopakinon bileşiğinin L-DOPA'ya dönüşümünü azaltarak melanin pigmentinin üretimini baskılar (11). Aynı zamanda melanin pigmentinin üretimini etkileyen serbest radikal oluşumunu engelleyerek UV ışınlarına karşı koruyucu özellik gösterir (10,73). Hızlı bir şekilde okside olduğu için ve dermal absorpsiyonu düşük olduğu için askorbik asitin kozmetik ürünlerde ve farmasötik preparatlarda kullanımı sınırlıdır. Bu yüzden sodyum askorbil fostat, askorbil miristat, askorbil tetra izopalmitat gibi oksidasyona karşı daha dayanıklı askorbik asit bileşikleri sentezlenmiş, kontrollü salım yapan sistemler ve farklı uygulama yöntemleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (11).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma Aldrich
Antitirozinaz antikor (T311)	Santa Cruz
cAMP (Cyclic adenosine monophosphate) ELISA Kit 96T	Elabscience
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Duchefa Biochemical
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (DPBS)	Biowest
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose	Biowest
Etanol	JT Baker
Florometrik Hücre içi Reaktif Oksijen Bileşikleri (ROS) kiti	Sigma Aldrich
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Himedia
Fötal Sığır Serum (FBS)	Biowest
Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC)	Abcam
Hybrid-R	Genall
İnsan L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) ELISA kiti	Sunred
İnsan Melanin ELISA kiti	Sunred
İnsan tirozinaz (TYR) ELISA kiti	Elabscience
L- Askorbik asit	Doğa İlaç
L-Glutamin Çözeltisi	Biowest
Metformin hidroklorür	Cayman
Normal Goat Serum Block	Biologend
Penisilin- Streptomisin karışımı	Biowest
Riboex	Geneall
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma Aldrich
Tripsin EDTA çözeltisi	Biowest
TritonX-100	Sigma Aldrich
WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity)	Wizbio
WizPure™ qPCR Master (SYBR)	Wizbio

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyulu plak	Greiner Bio-One, Nest
Biyolojik güvenlik kabini	Holten Lamin Air
Buzdolabı	Arçelik
Chamberslide	Ibidi
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	Mes MP Minipure/Thermo Scientific
Enjektör filtresi (0,22 Mikron por açıklığı)	Merck
Floresans mikroskopu	Leica
Hassas terazi	Mettler Toledo, XS105
Hücre kültür flaskları (25, 75 cm ²)	Greiner
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments Function Line
Işık mikroskobu	Leica
Kriyo tüp	Greiner Bio-One
Laboratuvar Tipi Kırık Buz Yapma Cihazı	Scotsman AF100
Lamel	Isolab
Neubauer Lamı	Marienfeld
Otoklav	Nüve NC40M
Otomatik Pipet (1-10 µl, 10- 100 µl, 20- 200 µl, 100-1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, Isolab
Otomatik Pipet uçları (1,10 µl, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, TrueLine
PCR Cihazı	QuantStudio
Santrifüj Cihazı	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
Spektrofotometre	Molecular Devices Sprektra Max M2
Steril Santrifüj Tüpleri	Greiner Bio-One
Steril Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One
Su banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX 3000L

3.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Hattı

Tez kapsamında lenf nodunda metastaz yapmış insan melanoma hücrelerinden türetilmiş hücre hattı (MNT-1, ATCC® CRL-3450™) kullanılmıştır. MNT-1 hücreleri American Type Cell Collection (ATCC)'den dondurulmuş olarak tedarik edilmiştir. MNT-1 hücreleri fibroblast benzeri morfolojiye sahip, adherent yapıdadır (120).

3.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Metformin Hidroklorür Çözeltisinin Hazırlanması

Metformin hidroklorürün moleküler ağırlığı 165,62 g/mol'dür. Hassas terazide 8,29 mg metformin hidroklorür tartılmış ve 10 ml besiyerinde çözülmüş ve 5000 µM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. 3 ml 5000 µM ana stok çözeltisi ve 3 ml besiyeri kullanılarak 2500 µM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 1,2 mL ana stok çözeltisi ve 4,8 ml besiyeri kullanılarak 1000 µM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 3 ml 1000 µM konsantrasyonda çözelti ve 3 ml besiyeri kullanılarak 500 µM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 2,5 ml 500 µM konsantrasyonda çözelti ve 2,5 ml besiyeri kullanılarak 250 µM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 1,8 ml 250 µM konsantrasyonda çözelti ve 2,7 ml besiyeri kullanılarak 100 µM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 1,5 ml 100 µM konsantrasyonda çözelti ve 1,5 ml besiyeri kullanılarak 50 µM konsantrasyonda metformin hidroklorür çözeltisi elde edilmiştir.

3.4.2. L-askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

L-askorbik asitin moleküler ağırlığı 176,12 g/mol'dür. Hassas terazide 8,9 mg L-askorbik asit tartılmış ve 10,11 ml besiyerinde çözülmüş ve 5000 µM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. 100 µl 5000 µM ana stok çözeltisi ve 900 µl besiyeri kullanılarak 500 µM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 500 µM konsantrasyondaki çözeltden 500 µl ve 4500 µl besiyeri kullanılarak 50 µM

konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 50 µM konsantrasyondaki çözülden 2,4 ml ve 3,6 ml besiyeri kullanılarak 20 µM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 20 µM konsantrasyondaki çözülden 2,25 ml ve 2,25 ml besiyeri kullanılarak 10 µM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 1,5 ml 10 µM konsantrasyondaki çözelti ve 1,5 ml besiyeri kullanılarak 5 µM konsantrasyonda L-askorbik asit çözeltisi hazırlanmıştır. 300 µl 10 µM konsantrasyondaki çözelti ve 2700 µl besiyeri kullanılarak 1 µM konsantrasyonda L-askorbik asit çözeltisi hazırlanmıştır. 300 µl 5 µM konsantrasyondaki çözelti ve 2700 µl besiyeri kullanılarak 0,5 µM konsantrasyonda L-askorbik asit çözeltisi hazırlanmıştır. L-askorbik asit ışıktan bozunduğu için çözelti hazırlama işlemi sırasında biyolojik güvenlik kabininin ışığı kapatılmıştır.

3.4.3. Besiyerinin Hazırlanması

Hücrelerin çoğaltılması için besiyeri olarak Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM High Glucose) kullanılmıştır. Besiyeri çözeltisi 500 ml DMEM'in üzerine 125 ml FBS (%20 konsantrasyonda), 6,3 ml penisilin, 6,3 ml streptomisin ve 6,3 ml esansiyel olmayan aminoasit çözeltisi eklenmiştir. Deneyler bittikten sonra buzdolabında +4°C sıcaklıkta en fazla 30 gün muhafaza edilmiştir (120).

3.4.4. MNT-1 Hücrelerinin Lizis İşleminde Kullanılan Çözümler

Lizis Tampon Çözeltisi:

CellLytic™ MT Memeli dokusu lizis/ekstraksiyon reaktifi kullanılmıştır. İçeriğinde 150 mM sodyum klorür (NaCl) ve proteinler ile en düşük girişime neden olan minimum konsantrasyonlarda deterjan ve bisin bileşenleri yer alır. +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Proteaz inhibitörü Çözeltisi:

Proteaz inhibitörü çözeltisinin içerisinde pepstatin A, bestatin, aprotinin, E-64 ve leupeptin bulunmaktadır. Bu çözeltinin görevi sistein, aspartik proteaz, serin ve aminopeptidazların inhibisyonuna neden olmaktadır. Derin dondurucuda -20°C 'de saklanmaktadır.

Proteaz İnhibitör Kokteyl Çözeltisi:

1 ml proteaz inhibitörü 100 ml lizis tampon çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.4.5. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler**Bakır Reaktifi:**

%1 Bakır sülfat (Cu_2SO_4), %2 Sodyum/potasyum (Na^+/K^+) tartarat ve 0,5 M sodyum hidroksit (NaOH) içinde %10 sodyum karbonat (Na_2CO_3) içeren çözeltidir. 1 ml Cu_2SO_4 , 1 ml Na^+/K^+ tartarat ve 50 ml Na_2CO_3 çözeltisi kullanılarak deneyden önce taze hazırlanır.

Folin Fenol:

Folin fenol çözeltisi hazır haldedir. Reaktif 1/10 oranında distile su ile dilüe edilerek hazırlanır.

Albumin Standartları:

50, 100, 150, 200 ve 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sığır serum albümini çözeltileri hazırlanarak kullanılır.

3.4.6. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit (DMSO):

Dimetil sülfoksit (C_2H_6OS) uçucu yapıda bir sıvıdır. 1,1 g/ml yoğunluğa sahip DMSO ışıktan korunması için oda sıcaklığında amber renkli şişelerde saklanmıştır.

3-(4,5- Dimetiltiyazol- 2- il) – 2,5 – Difeniltetrazolyum bromür Çözeltisi:

Hassas terazide 20 mg MTT tartılmış ve 40 ml besiyeri içerisinde çözülerek 0,5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisi elde edilmiştir. MTT çözeltisi ışıktan bozulduğundan ışıktan korunarak saklanmalıdır. Işıktan korunduğunda $+4^{\circ}C$ 'de 24 saat stabildir.

3.4.7. Reaktif Oksijen Bileşikleri Tayininde Kullanılan Çözeltiler

ROS tayin reaktifi:

Kit içerisinde 1 vial ROS tayin reaktifi bulunmaktadır. Hazırlama aşamasında kit içerisindeki DMSO ile seyreltilmiştir. $-20^{\circ}C$ sıcaklıkta saklandığında 1 ay boyunca dayanıklıdır.

Dimetil Sülfoksit:

Kit içerisinde 0,1 ml DMSO bulunmaktadır. Kullanıma hazır haldedir.

Deney Tamponu:

Kit içerisinde 20 ml deney tamponu bulunmaktadır. Kullanıma hazır haldedir ve $-20^{\circ}C$ 'de saklandığında kitin üzerinde yer alan son kullanma tarihine kadar dayanıklıdır.

Master Reaksiyon Karışımı:

10 ml deney tamponu çözeltisinin içerisine 20 µl ROS tayin reaktifi eklenmesiyle hazırlanan karışımdır. Deneye başlanmadan hemen önce hazırlanmıştır ve hazırlandıktan sonra 2 saat geçmeden kullanılması gerekmektedir.

3.4.8. Işık Mikroskobu İncelemelerinde Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Fosfat Tamponu:

Hazırlanılan 20 ml disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi ile 80 ml sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) çözeltisi karıştırıldıktan sonra 100 ml distile su eklenerek ve 1:1 oranında dilüe edilir. Çözeltinin pH'si 7,42'ye ayarlanır ve fiksasyon işleminin ardından yıkama işlemlerinde kullanılır. Fosfat Tamponu buzdolabında +4 °C sıcaklıkta saklandığında 4 ay boyunca dayanıklıdır.

Metilen Mavisi Çözeltisi:

Metilen mavisi çözeltisini hazırlamak için öncelikle 1 g disodium tetrahidroborat (Na_2BH_4) ve 1 g metilen mavisi tartılır. Tartılan maddeler 100 ml distile suda çözülerek %1 (a/h) konsantrasyonda çözelti elde edilir.

3.4.9. Tirozinaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Deneye başlanmadan önce kit içerisinde yer alan tüm reaktifler oda ısısına getirilmiştir (137).

Referans Standart Çözeltisi:

2 vial referans standart çözeltisi tirozinaz ELISA kitin içerisinde hazır olarak yer almaktadır.

Referans Standart ve Numune Dilüsyon Çözeltisi:

Tirozinaz ELISA kitin içerisinde 20 ml çözelti hazır olarak yer almaktadır. Standart ve numuneleri seyreltmek için kullanılmaktadır.

Standart Çalışma Çözeltisi:

Referans standart çözeltisi 10.000×g'de 1 dakika santrifüjlenir. Referans standardın üzerine 1 ml numune dilüsyon çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika beklenir. Hazırlanan çözelti bu aşamada birkaç defa yavaşça ters çevrilebilir. Çözündüğü kontrol edildikten sonra pipet yardımıyla güzelce karıştırılır. Bu işlemle 40 ng/ml konsantrasyonda bir çalışma çözeltisi elde edilir. Ardından 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,63 ng/ml, 0 ng/ml konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlanır.

Konsantre Biotinlenmiş Tespit Ab Solüsyonu:

100X konsantrasyonda 120 µL çözelti tirozinaz ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Biyotinlenmiş Tespit Ab Dilüsyon Çözeltisi:

Tirozinaz ELISA kitin içerisindeki 14 ml hacimde çözelti biyotinlenmiş tespit Ab Çalışma Çözeltisini hazırlamak için kullanılmaktadır.

Biyotinlenmiş Tespit Ab Çalışma Çözeltisi:

Deneye başlanmadan önce her kuyucukta 100'er µL çözelti olacak şekilde gereken çözelti miktarı hesaplanır. Konsantre biyotinlenmiş tespit Ab Solüsyonu 800×g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenir. Ardından 100× Konsantre biyotinlenmiş tespit Ab çözeltisi, Biyotinlenmiş tespit Ab Seyreltme Solüsyonu ile 1x çalışma solüsyonuna seyreltilir.

Konsantre HRP Konjugat Çözeltisi:

100x konsantrasyonda 120 µL konsantre HRP konjugat çözeltisi tirozinaz ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

HRP Konjugat Dilüsyon Çözeltisi:

Tirozinaz ELISA kitin içerisindeki 14 ml hacimde çözelti HRP konjugat çalışma çözeltisini hazırlamak için kullanılmaktadır.

Konsantre HRP Konjugat Çalışma Solüsyonu:

Deneye başlanmadan önce her kuyuda 100'er µL çözelti olacak şekilde gereken çözelti miktarı hesaplanır. Hazırlama aşamasında, hesaplanandan biraz daha fazla çözelti hazırlanmalıdır. Konsantre HRP konjugatı 800×g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenir; ardından 100× konsantre HRP konjugatı HRP konjugat seyreltici ile 1x çalışma solüsyonuna seyreltilir.

Yıkama Tamponu:

30 ml konsantre yıkama tamponu ve 720 ml distile su kullanılarak 750 ml yıkama tamponu çözeltisi hazırlanmıştır. Konsantrede kristaller oluşmuşsa, 40°C sıcaklıkta bir su banyosu kullanılarak ısıtılabilir ve kristaller çözünene kadar hafifçe karıştırılabilir.

Substrat Reaktifi:

10 ml substrat reaktifi tirozinaz ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Stop Solüsyonu:

Reaksiyonun durdurulması için kullanılan 10 ml stop solüsyonu tirozinaz ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

3.4.10. Tirozinaz Gen Ekspresyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Riboex

GeneAll® markalı RiboEx™ insan, hayvan, bitki, maya, bakteri ve virüs kaynaklı numunelerden toplam RNA izolasyonu için kullanıma hazır reaktifler içeren bir kittir. RiboEx™, guanidin tuzu/deterjan solüsyonunda hücrelerin parçalanması, ardından RNA'nın organik ekstraksiyonu ve alkol ile çökelti oluşturması esasına dayanır ve çok sayıda numunenin aynı anda işlenmesine olanak tanır.

Hybrid-R

GeneAll® markalı Hybrid-R™ insan, hayvan, bitki, maya, bakteri ve virüs kaynaklı numunelerden yüksek düzeyde saflaştırılmış toplam RNA izolasyonu için kolay ve hızlı bir yöntem sağlar. Hybrid-R™, RNA'yı kolona bağlayarak alkol ile çökelti oluşturmasını ortadan kaldırır ve çok sayıda numuneden eş zamanlı olarak hızlı ve rahat bir şekilde sonuç elde edilmesine olanak tanır.

cDNA Sentezi İçin Kullanılan Mastermix Çözeltisi

cDNA sentezi için 2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1 µl 20X dNTP mix, 2 µl Random hexamer, 1 µl WizScript™ RTaz, 0.5 µl RNaz inhibitörü, 3.5 µl RNaz içermeyen su ve 10 µl RNA örneği kullanılarak toplamda 20 µl hacminde ana karışım (mastermix) çözeltisi hazırlanmıştır. 10X reaksiyon tamponu, 20X dNTP karışımı, Random hekzamer, WizScript™ RTaz ve RNaz içermeyen su WizScript™ cDNA Sentez Kiti (Yüksek Kapasite) isimli kitin içerisinde hazır olarak yer almaktadır.

Real-Time qPCR İçin Kullanılan Ana Karışım özeltisi

10 µl 2X ana karışım (MasterMix with SYBR-Green), 1 µl ROX boyası, 1 µl ileri primer (10 µM), 1 µl ters primer (10 µM), 4 µl cDNA kalıbı ve 3 µl RNaz içermeyen distile su kullanılarak toplamda 20 µl hacminde ana karışım çözeltisi hazırlanmıştır. Ana karışım (MasterMix with SYBR-Green) ve ROX Dye WizPure™ qPCR Master (SYBR) isimli kitin içerisinde hazır olarak yer almaktadır.

3.4.11. Tirozinazın İmmunfloresan Olarak İşaretlenmesinde Kullanılan özelti

Fosfat Tamponlu Salin (PBS) özeltisi

2,14 gram PBS tartılmış ve 250 ml deiyonize su eklenerek hazırlanmıştır.

% 2,5 Sığır Serum Albumini (BSA)- Fosfat Tamponlu Salin (PBS) özeltisi

1,25 gram BSA ve 50 ml PBS kullanılarak hazırlanmıştır.

% 0,1 TritonX-100 özeltisi

10 µL TritonX-100 ve 10 ml deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır.

Blocking Serum özeltisi

Normal serum blok çözeltisi ve 150 µL keçi serumu kullanılarak hazırlanmıştır.

Primer Antikor özeltisi

4,5 µL tirozinaz antikorunu (T311) 895,5 µL % 2,5 BSA-PBS ile 1:200 oranında olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır.

Sekonder Antikor Çözeltisi

1,8 µL Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC) (ab6785), 9 µL %1 NHS ve 889,2 µL BSA-PBS ile 1:500 oranında olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.4.12. Melanin Oluşumunun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi

240 ng/ml konsantrasyona sahip 0,5 ml hacimde çözeltidir. Melanin ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Standart Dilüsyon Çözeltisi

Standart çalışma çözeltisinden dilüsyonla 120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml ve 7,5 ng/ml konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan çözeltidir. 3 ml standart dilüsyon çözeltisi melanin ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Streptavidin-HRP Konjugat Reagent

6 ml streptavidin-HRP konjugat reagent melanin ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Yıkama Solüsyonu

Melanin ELISA kitin içerisinde 30x konsantrasyondaki yıkama solüsyonu hazır olarak bulunmaktadır. Deneylerde 30x konsantrasyondaki yıkama çözeltisi x konsantrasyona seyreltilerek kullanılmıştır.

Biyotin Melanin Ab Solüsyonu

Melanin ELISA kitin içerisinde 1 ml Biyotin Melanin Ab Solüsyonu hazır olarak bulunmaktadır.

Kromojen Solüsyonu A

Melanin ELISA kitin içerisinde 6 ml Kromojen Solüsyonu A hazır olarak bulunmaktadır.

Kromojen Solüsyonu B

Melanin ELISA kitin içerisinde 6 ml Kromojen Solüsyonu B hazır olarak bulunmaktadır.

Stop Solüsyonu

Reaksiyonun durdurulması için kullanılan 6 ml stop solüsyonu melanin ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

3.4.13. c-AMP Oluşumunun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına (18-25 °C) getirilmiştir. Mikroplaklar mikropilaka okuyucunun kılavuzunda belirtildiği gibi optik yoğunluk ölçüm işleminden 15 dakika önce ısıtılmasına dikkat edilmiştir (138).

Referans Standart Çözeltisi:

2 vial referans standart çözeltisi c-AMP ELISA kitin içerisinde hazır olarak yer almaktadır.

Referans Standart ve Numune Dilüsyon Çözeltisi:

c-AMP ELISA kitin içerisinde 20 ml çözelti hazır olarak yer almaktadır. Standart ve numuneleri seyreltmek için kullanılmaktadır.

Standart Çalışma Çözeltisi:

Referans standart çözeltisi 10.000×g'de 1 dakika santrifüjlenir. Referans standardın üzerine 1 ml numune dilüsyon çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika beklenir. Hazırlanan çözelti bu aşamada birkaç defa yavaşça ters çevrilebilir. Çözündüğü kontrol edildikten sonra pipet yardımıyla güzelce karıştırılır. Bu işlemle 100 ng/ml konsantrasyonda bir çalışma çözeltisi elde edilir. Ardından 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml, 1,56 ng/ml, 0 ng/ml konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlanır.

Konsantre Biotinlenmiş Tespit Ab Solüsyonu:

100x konsantrasyonda 120 µL çözelti c-AMP ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Biotinlenmiş Tespit Ab Dilüsyon Çözeltisi:

c-AMP ELISA kitin içerisindeki 14 ml hacimde çözelti biyotinlenmiş tespit Ab Çalışma Çözeltisini hazırlamak için kullanılmaktadır.

Biotinlenmiş Tespit Ab Çalışma Çözeltisi:

Deneye başlanmadan önce her kuyucukta 50'şer µL çözelti olacak şekilde gereken çözelti miktarı hesaplanır. Hazırlama aşamasında, hesaplanandan biraz daha fazla çözelti hazırlanmalıdır. Kullanmadan önce stok tüpü santrifüjlenir. Ardından 100× Konsantre Biotinlenmiş Saptama Ab Solüsyonu, biyotinlenmiş tespit Ab Seyreltme Solüsyonu ile 1x çalışma solüsyonuna seyreltilir.

Konsantre HRP Konjugat Çözeltisi:

100x konsantrasyonda 120 µL konsantre HRP konjugat çözeltisi c-AMP ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

HRP Konjugat Dilüsyon Çözeltisi:

c-AMP ELISA kitin içerisindeki 14 ml hacimde çözelti HRP konjugat çalışma çözeltisini hazırlamak için kullanılmaktadır.

Konsantre HRP Konjugat Çalışma Solüsyonu:

Deneye başlanmadan önce her kuyucukta 100'er µL çözelti bulunacak şekilde gereken çözelti miktarı hesaplanır. Hazırlama aşamasında, hesaplanandan biraz daha fazla çözelti hazırlanmalıdır. 100× Konsantre HRP konjugatı HRP konjugat dilüsyon çözeltisi ile 1x çalışma solüsyonuna seyreltilir.

Yıkama Tamponu:

30 ml konsantre yıkama tamponu ve 720 ml distile su kullanılarak 750 ml yıkama tamponu çözeltisi hazırlanmıştır. Konsantrede kristaller oluşmuşsa, 40°C sıcaklıkta bir su banyosu kullanılarak ısıtılabilir ve kristaller çözünene kadar hafifçe karıştırılabilir.

Substrat Reaktifi:

10 ml substrat reaktifi c-AMP ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Stop Solüsyonu:

Reaksiyonun durdurulması için kullanılan 10 ml stop solüsyonu c-AMP ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

3.4.14. L-DOPA Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Standart Çalışma Çözeltisi:

240 ng/ml konsantrasyona sahip 0,5 ml hacimde çözeltidir. L-DOPA ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Standart Dilüsyon Çözeltisi:

Standart çalışma çözeltisinden dilüsyonla 120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml ve 7,5 ng/ml konsantrasyonlarda standart çözeltilerin hazırlanması için kullanılan çözeltidir. 3 ml standart dilüsyon çözeltisi L-DOPA ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Streptavidin-HRP Konjugat Reagent:

6 ml Streptavidin-HRP konjugat reaktif L-DOPA ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Yıkama Solüsyonu:

L-DOPA ELISA kitin içerisinde 30x konsantrasyondaki yıkama solüsyonu hazır olarak bulunmaktadır. Deneylerde 30x konsantrasyondaki yıkama çözeltisi x konsantrasyona seyreltilerek kullanılmıştır.

Biyotin L-DOPA Ab Solüsyonu:

L-DOPA ELISA kitin içerisinde 1 ml Biyotin L-DOPA Ab Solüsyonu hazır olarak bulunmaktadır.

Kromojen Solüsyonu A:

L-DOPA ELISA kitin içerisinde 6 ml Kromojen Solüsyonu A hazır olarak bulunmaktadır.

Kromojen Solüsyonu B:

L-DOPA ELISA kitin içerisinde 6 ml Kromojen Solüsyonu B hazır olarak bulunmaktadır.

Stop Solüsyonu:

Reaksiyonun durdurulması için kullanılan 6 ml stop solüsyonu L-DOPA ELISA kitin içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

3.5. Deneysel İşlemler**3.5.1. *In Vitro* Hücre Kültürü**

MNT-1 melanoma hücrelerinin proliferasyonunu sağlamak için kullanılacak besiyerini hazırlamak için 500 ml DMEM'in üzerine 125 ml FBS, 6,3 ml penisilin, 6,3 ml streptomisin ve 6,3 ml esansiyel olmayan aminoasit çözeltisi eklenmiştir. Hücreler 75 ve 25 cm² hücre kültürü flaskları içerisinde, %100 nem, 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatör içerisinde çoğaltılmıştır. Hücreler kültür flasklarında uygun yoğunluğa gelinceye kadar uygun periyotlarda besiyeri değiştirilmiştir. Mikroskopta hücrelerin uygun yoğunluğa ulaştığı görüldükten sonra pasajlanarak çoğaltılmıştır (120).

3.5.2. Çalışma Grupları

- 1. Kontrol grubu:** Hiçbir uygulama yapılmayacak MNT-1 hücre hattı.
- 2. Metformin grubu:** Sitotoksisite deneyleri sonucunda sitotoksik etki göstermediği belirlenen 50 µM metforminin uygulanacağı grup.
- 3. Askorbik asit grubu:** Sitotoksisite deneyleri sonucunda sitotoksik etki göstermediği belirlenen 0,5 µM askorbik asidin uygulandığı grup.

- 4. Metformin+Askorbik asit grubu:** Sitotoksisite deneyleri sonucunda sitotoksik etki göstermediği belirlenen maksimum metformin+ askorbik asit dozlarının (50µM metformin + 0,5 µM askorbik asit) uygulandığı grup.

3.5.3. Hücre Kültüründe Çözme ve Dondurma İşlemleri

Çözme Prosedürü:

1. Çalışmaya başlamadan hemen önce deneyde kullanılacak bütün malzemeler % 70'lik etanol yardımıyla temizlenmiştir. Ardından biyogüvenlik kabinin içerisine yerleştirilmiştir.
2. Su banyosunun su seviyesi kontrol edilmiş ve 37°C sıcaklığa ayarlanmıştır.
3. Etüv çalıştırılarak sıcaklığın 37°C, CO₂ seviyesinin % 5 olduğu kontrol edilmiştir.
4. Hücrelerin çoğalması için hazırlanan besiyeri 4°C buzdolabından çıkarılmış ve su banyosunda ısınması sağlanmıştır.
5. -80°C sıcaklıkta kriyo tüpte saklanan MNT-1 hücreleri dondurucudan çıkarılmış ve buzun üzerine aktarılmıştır.
6. Hücrelerin çözülmesi için kriyo tüp 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda 2 dk ısıtılmıştır. Bu aşama hücrelerin çabuk çözünmesi ve kontaminasyona uğraması ihtimallerine karşılık dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmiştir.
7. Kriyo tüp içerisinde süspende halde bulunan MNT-1 hücreleri % 70'lik etanol ile sterilize edilmiş 15 ml hacimde bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

8. Santrifüj tüpünün içerisine yavaş bir şekilde besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak hücreler süspande hale getirilmiştir. Osmotik şok riskinden dolayı bu aşamanın yavaş bir şekilde yapılmasına özen gösterilmiştir.
9. Hücreler 1500 devirde 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
10. Santrifüj işlemi bittikten sonra DMSO içeren süpernatant atılmıştır ve dipte kalan hücre pelletinin üzerine besiyeri eklenmiştir.
11. Hücre pelletinin üzerine besiyeri eklendikten sonra pipetaj işlemiyle süspande hale getirilmiştir ve uygun boyutlardaki yeni hücre kültürü flasklarına aktarılmıştır.
12. Flaska aktarılan hücreler ışık mikroskobu yardımıyla incelenmiştir.
13. Yeni flaskların içerisinde yer alan hücreler 37 °C sıcaklık, % 100 nem ve % 5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatöre koyulmuştur.

Dondurma Prosedürü:

1. Işık mikroskobu yardımıyla hücre kültürü flaskları her gün kontrol edilmiştir ve hücreler proliferasyon olarak flaskta yeterli yoğunluğa geldiklerinde daha sonra farklı testlerde kullanılmak üzere dondurulmuştur. Donmuş hücreler derin dondurucuda -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.
2. Çalışmaya başlamadan hemen önce deneyde kullanılacak bütün malzemeler % 70'lik etanol yardımıyla temizlenmiştir. Ardından biyogüvenlik kabinin içerisine yerleştirilmiştir.
3. Su banyosunun su seviyesi kontrol edilmiş ve 37°C sıcaklığa ayarlanmıştır.

4. Trypsin-EDTA çözeltisi ve besiyeri buzdolabında (+4°C) saklandığından deneyden önce 37°C su banyosunda ısıtılmıştır.
5. 1800 µl besiyeri ve 200 µl DMSO kullanılarak toplamda 2 ml olmak üzere dondurma işlemi için gerekli olan dondurma besiyeri çözeltisi hazırlanmıştır.
6. Kültür flaskları inkübatörden alınıp besiyeri bir pipet yardımıyla çekilmiştir.
7. Flaskların içine 4 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiştir ve hücreler enzimin aktif hale gelmesi için 5 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir.
8. Hücreler adheren yapıda olduklarından inkübatörden çıkarılan flasklar ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir. Hücrelerin flaskın tabanından ayrıldıkları görüldükten sonra flaskın içerisine 6 ml besiyeri eklenmiştir.
9. Süspande hücreler ve besiyeri steril santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 1500 devirde 5 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.
10. Santrifüj bittikten sonra üstte kalan süpernatant atılmıştır.
11. Dipte kalan hücre pelletinin üzerine daha önce hazırlanan 2 ml dondurma besiyeri eklenmiştir ve yavaşça pipetaj işlemi uygulanarak süspande edilmiştir.
12. Hücrelerin dondurulması için kullanılacak kriyo tüpün üzerinde yer alan etikete hücre bilgileri kaydedilmiş ve hazırlanan hücre süspansiyonu kriyo tüpün içerisine aktarılmıştır.
13. Kriyo tüp birkaç saat -20°C'de bekletilmiştir.

14. Sonrasında -20°C 'den çıkarılan kriyo tüp saklamak için -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.5.4. Hücrelerin Alt Kültür Prosedürü

1. Hücre kültürü flaskının içerisindeki hücreler her gün ışık mikroskopunda gözlenmiştir. Hücrelerin kültür flaskı içerisinde yeterli yoğunluğa ulaşmaları hücrelerin pasajlanmak için hazır olduğu anlamına gelmektedir.
2. Çalışmaya başlamadan hemen önce deneyde kullanılacak bütün malzemeler % 70'lik etanol yardımıyla temizlenmiştir. Ardından biyogüvenlik kabininin içerisine yerleştirilmiştir.
3. Su banyosunun su seviyesi kontrol edilmiş ve 37°C sıcaklığa ayarlanmıştır.
4. Tripsin-EDTA çözeltisi ve besiyeri buzdolabında ($+4^{\circ}\text{C}$) saklandığından deneyden önce 37°C su banyosunda ısıtılmıştır.
5. Flaskların içinde bulunan besiyeri pipetle çekilerek atılmıştır.
6. Flaskların içine 4 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiştir ve hücreler enzimin aktif hale gelmesi için 5 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir.
7. Hücreler adheren yapıda olduklarından inkübatörden çıkarılan flasklar ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir. Hücrelerin flaskın tabanından ayrıldıkları görüldükten sonra flaskın içerisine 6 ml besiyeri eklenmiştir.
8. Süspande hücreler ve besiyeri steril santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 1500 devirde 5 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

9. Santrifüj bittikten sonra üstte kalan süpernatant atılmıştır. Dipte kalan hücre pelletinin üzerine yeterli miktarda besiyeri eklenmiştir ve yavaşça pipetaj işlemi uygulanarak süspansiyon edilmiştir.
10. Besiyeri içerisindeki hücreler uygun boyutlarda flaslara ekilmiştir.
11. Flaskların üzerine hücre bilgileri (hücre türü, pasaj tarihi, pasaj numarası, besiyeri bilgileri vb.) kaydedilmiş ve yeni flaskların içerisinde yer alan hücreler 37 °C sıcaklık, %100 nem ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatöre koyulmuştur.

3.5.5. Hücre Sayımı İşlemi

Hücre sayımı için farklı yöntemler yer almakla birlikte bu çalışmada tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Tripan mavisi (-) yüklü bir boyadır ve ölü hücrelerin hücre zarı bütünlüğü bozulduğundan hücre içerisine girerek ölü hücrelerin boyanmasına neden olmaktadır.

Hücre Sayımı Prosedürü:

1. Hücre kültürü flaskının içerisindeki hücreler her gün ışık mikroskopunda gözlenmiştir. Hücrelerin kültür flaskı içerisinde yeterli yoğunluğa ulaştıkları kontrol edildikten sonra besiyeri atılmıştır.
2. Flaskların içine 4 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiştir ve hücreler enzimin aktif hale gelmesi için 5 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir.
3. Hücreler adheren yapıda olduklarından inkübatörden çıkarılan flasklar ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir. Hücrelerin flaskın tabanından ayrıldıkları görüldükten sonra flaskın içerisine 5 ml besiyeri eklenmiştir.

4. Süspande hücreler ve besiyeri steril santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 1500 devirde 5 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.
5. Santrifüj bittikten sonra üstte kalan süpernatant atılmıştır. Dipte kalan hücre pelletinin üzerine 20 ml besiyeri eklenmiştir ve yavaşça pipetaj işlemi uygulanarak süspande edilmiştir.
6. 50 µl hücre süspansiyonu sterilize edilmiş bir eppendorf tüpe aktarılmıştır. %0,4 konsantrasyonda 50 µl tripan mavisi boyası eklenmiş ve pipet yardımıyla süspansiyon haline getirilmiştir.

Tripan mavisi çözeltisi ile karıştırılan hücreler Neubauer hücre sayım lamı üzerine aktarılmıştır. Bu aşamada lamın her iki tarafında da 10 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde hazırlanmasına dikkat edilmiştir. Neubauer hücre sayım lamının üst kısmında 4 adet ve alt kısmında 4 adet olmak üzere toplam 8 tane karesi bulunmaktadır. Bu karelerin içerisinde yer alan hücreler, ışık mikroskopunda sayılarak en son aşamada toplam hücre sayısının ortalaması hesaplanmıştır. ml'deki canlı hücre sayısı "**ml'deki toplam hücre sayısı = (Sayılan toplam hücre sayısı/ 8)x seyreltme faktörü x 10.000/ml**" formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

7. İlgili formül kullanılarak canlı hücre derişimi belirlendikten sonra besiyeri ile dilüsyon yapılarak hücreler 96 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır.
8. 96 kuyucuklu plaktaki hücreler 1 gece boyucunda inkübatöre bekletilerek hücrelerin plağa tutunması ve proliferasyonu gerçekleşmiştir.

3.6. Yöntemler

3.6.1. MNT-1 Melanoma Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiyazol- 2- il)-2,5- Difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Sitotoksisitenin tayini için alanyazında birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Hücre canlılığının belirlenmesi için bu tez kapsamında MTT yöntemi kullanılmıştır. IUPAC ismi 3-(4,5-Dimetiltiyazol- 2- il)-2,5- difeniltetrazolyum bromür olan MTT maddesi ile hücre proliferasyonu ve canlılığı spektrofotometrik olarak belirlenebilmektedir. MTT maddesinin yapısında yer alan tetrazolyum halkasının metabolik olarak aktif hücreler tarafından açılması esasına dayanmaktadır. Prolifere olan hücrelerin mitokondrilerinde dehidrogenaz aktivitesinin artması ile sarı renkte olan tetrazolyum bileşiği mor renkte formazan kristallerine dönüşür. Formazan kristalleri DMSO eklenerek çözülür ve 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri belirlenerek hücre canlılığı tayin edilir.

Yöntemin Uygulanışı:

1. 96 kuyucuklu plaktaki hücreler 1 gece boyunca inkübatöre bekletilerek hücrelerin plağa tutunması ve proliferasyonu gerçekleşmiştir.
2. 1 günün sonunda biyolojik güvenlik kabini içerisinde besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır.
3. Hücelere MNT-1 hücreleri için hazırlanan besiyeri içerisinde çözülmüş, 0,1-25 μ M konsantrasyon aralığında askorbik asit çözeltisi ve 50-5000 μ M konsantrasyon aralığında metformin hidroklorür çözeltisi uygulanmıştır.

4. Kontrol grubunda yer alan hücrelere yalnızca besiyeri ilave edilmiştir.
5. Metformin ve askorbik asite maruz kalan kuyucuklarda yer alan çözeltiler 24 saat inkübasyon süresinin sonunda uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 100'er µl 0,5 mg/ml konsantrasyonda taze hazırlanan MTT çözeltisi ilave edilmiştir.
6. MTT çözeltisi eklendikten sonra plaklar etüv içerisinde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir.
7. 3 saatlik inkübasyon bitince MTT çözeltisi kuyucuklardan çekilmiştir. Canlı hücrelerin dehidrogenaz aktivitesi sonucunda oluşan formazan kristallerinin üzerine 100'er µl DMSO eklenmiştir ve çalkalayıcıda 5 – 10 dk çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır.
8. Absorbanslar spektrofotometri yöntemiyle 570 nm dalgaboyunda belirlenmiştir.
9. MTT çözeltisi ışıhta bozunduğu için deney süresince ışıklar kapalı tutulmuştur.
10. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin ortalaması, %100 olarak kabul edilerek her bir doz için hücre canlılığı hesaplanmıştır.
11. Deneyler 3 farklı günde, her gün içinde 2 ayrı tekrar olacak şekilde yapılmıştır.



Şekil 3.1. Dehidrogenazlar ile canlı hücrelerde MTT'nin formazan kristallerine dönüşmesi

Hücre Canlılığının Hesaplanması:

Yalnızca besiyeri uygulanan kontrol grubu hücrelerinin canlılığı %100 olarak kabul edilmiş, “*%Canlılık = 100 X (Çalışma gruplarının absorbans değeri ortalaması / Kontrol grubunun absorbans değeri ortalaması)*” formülü kullanılarak metformin, askorbik asit ve metformin+askorbik asit gruplarının canlılığı kontrol grubuna kıyasla % canlılık olarak belirlenmiştir.

3.6.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Hücre için reaktif oksijen türevlerinin belirlenmesi için literatürde farklı yöntemler yer almaktadır. Bu tez kapsamında florometrik olarak ROS belirlenmesi amaçlanmıştır. 5- ve 6- klorometil-2',7'- diklorodihidrofloresein diasetat (CM-H₂DCFDA) floresan özellik göstermeyen bir probdur. CM-H₂DCFDA metabolik olarak aktif hücreler tarafından 2',7'-diklorofloresein (CM-DCF)'e dönüştürülmektedir. Bu dönüşümle oluşan floresansın ölçülmesi ile hidroksil ve süperoksit radikalleri gibi ROS bileşiklerinin seviyeleri belirlenebilmektedir (139).

Yöntemin Uygulanışı:

1. Deneye başlanmadan önce kit içerisinde yer alan tüm reaktifler 18-25 °C'ye getirilmiştir.

2. 40 µl DMSO ve ROS tayin reaktifi karıştırılmış ve 500X konsantrasyonda ROS tayin reaktifi elde edilmiştir.
3. 90 µl besiyeri içerisinde yer alan MNT-1 hücreleri 96 kuyucuğa sahip siyah renkli hücre plağına aktarılmıştır.
4. Metformin, askorbik asit ve metformin + askorbik asit test maddelerinin 10 katı (10X) dozlarda besiyeri içerisinde çözülerek hazır hale getirilmiştir.
5. Kuyucuktaki hücrelerin üzerine 10X konsantrasyonda hazırlanan metformin, askorbik asit, metformin+askorbik asit çözeltilerinden 10'ar µl eklenmiştir. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmayacağından bu kuyucuklara yalnızca 10'ar µl besiyeri ilave edilmiştir.
6. Plak 37 °C sıcaklığa sahip inkübatörde 30 dk boyunca inkübe edilmiştir.
7. 500X konsantrasyonda hazırlanan ROS tayin reaktifinden 20 µl alınmıştır. 10 ml deney tamponu içerisinde çözülerek master reaksiyon karışımı elde edilmiştir.
8. Plaktaki her bir kuyucuğun üzerine 100'er µl master reaksiyon karışımı ilave edilmiştir.
9. Hücre kültür plağı 30 dakika – 1 saat civarında 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edilmiştir.
10. İnkübasyon süresi bitince eksitasyon için 540 nm ve emisyon için 570 nm dalga boylarında her bir kuyucukta yer alan çözeltilerin floresans değerleri belirlenmiştir.

ROS Düzeylerinin Hesaplanması:

Kontrol grubunda yer alan MNT-1 hücrelerinin ürettiği hücre içi ROS miktarı %100 olarak kabul edilmiştir. Metformin, askorbik asit ve metformin+askorbik asit gruplarının ürettiği ROS miktarları kontrol grubuyla kıyaslanarak % ROS değerleri tespit edilmiştir.

3.6.3. Tirozinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Tirozinaz aktivitesi sandviç-ELISA prensibini kullanan bir ELISA kiti ile belirlenmektedir. Tirozinaz kitinde yer alan mikro ELISA plağı, insan tirozinazına (TYR) özgü bir antikora önceden kaplanmıştır. Örnekler (veya Standartlar) mikro ELISA plaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antikora ile birleştirilir. Daha sonra İnsan TYR'sine ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoru, her bir mikro plaka kuyucuğuna art arda eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanır. Substrat çözeltisi her kuyucuğa eklenir. Yalnızca İnsan TYR'si, biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve renk sarıya döner. Optik yoğunluk 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Optik yoğunluk değeri, insan TYR'sinin konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin optik yoğunluğu standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki insan TYR konsantrasyonu hesaplanır (137).

Yöntemin Uygulanışı:

1. Seyreltilmiş standart, kör çözelti ve numune için kuyucuklar belirlenir ve uygun kuyucuklara standart çalışma çözeltilerinden, kör çözeltilerden ve numunelerden 100 μ L eklenir. Tüm numuneler ve standartlar iki kopya halinde test edilmiştir. Plaka, kitiye yer alan plaka kapatıcı ile örtülür ve 37°C'de 90 dakika inkübe edilir. Solüsyonlar mikro ELISA plaka

kuyusunun dibine eklenmeli, mümkün olduğunca iç duvara dokunmaktan ve köpürmeye neden olmaktan kaçınılmalıdır.

2. Her kuyuda yer alan çözeltiler boşaltılır, yıkanmaz. Hemen her kuyuya 100 µL biyotinlenmiş tespit Ab çalışma solüsyonu eklenir. Plaka yeni bir plaka kapatıcı ile örtülür ve 37°C'de 1 saat inkübe edilir.
3. Çözelti her kuyudan boşaltılır, her kuyucuğa 350 µL yıkama tamponu eklenir. 1 dakika bekletilir ve solüsyon her kuyudan aspire edilir veya boşaltılır ve temiz su emici kağıda hafifçe vurarak kurutulur. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlanır.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklenir. Plaka yeni bir plaka kapatıcı ile örtülür ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
5. Çözelti her kuyudan boşaltılır, yıkama işlemi 3. adımda gerçekleştirildiği gibi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklenir. Plaka yeni bir plaka kapatıcı ile örtülür ve 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edilir. Bu aşamada plaka ışıktan korunmalıdır.
7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenir. Durdurma solüsyonunun eklenmesi, substrat solüsyonuyla aynı sırada yapılmalıdır.
8. 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile her kuyunun optik yoğunluğu belirlenir.

Tirozinaz Düzeyinin Belirlenmesi

Her standart ve numune için çift okumaların ortalaması alınır. x ekseninde tirozinaz konsantrasyonu ve y ekseninde optik yoğunluk değerleri ile log-log ekseninde dört parametrelili bir lojistik eğri çizilir (137).

3.6.4. Tirozinaz Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi

Yöntemin Esası:

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), 1983 yılında Mullis tarafından bulunmuş ve 1985 yılında patenti alınmıştır. Bu yöntem, bir DNA ekstraktından (DNA şablonu) belirli bir DNA fragmanının (ilgili dizi, ilgili DNA veya hedef DNA) DNA polimeraz kullanımıyla milyarlarca kopyasının üretilebilmesi esasına dayanmaktadır. Hücresel ve moleküler biyolojide vazgeçilmez bir teknik olan PCR'nin birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Gerçek zamanlı PCR, rekabetçi PCR, in situ PCR gibi farklı PCR yöntemleri kullanılmaktadır (140). Bu tez çalışmasında tirozinaz gen ekspresyonunun belirlenmesi için kantitatif ters transkripsiyon PCR (RT-qPCR) yöntemi kullanılmıştır.

Kantitatif ters transkripsiyon PCR (RT-qPCR), başlangıç materyali RNA olduğunda kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, RNA önce total RNA'dan veya haberci RNA'dan (mRNA) ters transkriptaz ile tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) kopyalanır. Daha sonra cDNA, qPCR reaksiyonu için şablon olarak kullanılır. RT-qPCR, gen ekspresyonu analizi dışında RNAi doğrulaması, mikroarray doğrulaması, patojen tespiti, genetik test ve hastalık araştırması gibi çeşitli uygulamalarda kullanılan bir yöntemdir (140).

Yöntemin Uygulanışı:

mRNA İzolasyonu:

1. Numunelerin üzerine 1 ml RiboEx eklenmiştir.
2. Oda ısısında 5 dk. inkübe edilmiştir.
3. Karışım 4°C'de 11.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatant başka bir tüpe aktarılmıştır.

4. Karışım üzerine 200 µl kloroform eklenerek karıştırılmış ve 2 dk. inkübe edilmiştir.
5. +4°C de 12.000×g'de 15 dk santrifüjlenerak süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır.
6. Süpernatantın hacmi kadar RB1 Buffer eklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
7. 700 µl karışım kolona aktarılmıştır.
8. 10.000×g'de 30 sn. santrifüjün ardından collection tüp yenisi ile değiştirilmiştir.
9. Karışımdan kalan miktar olması durumunda 7 ve 8 numaralı adımlar tekrarlanmıştır.
10. Kolon üzerine 500 µl SW1 Buffer eklenmiştir.
11. 10.000×g de 30 sn. santrifüjün ardından collection tüp yenisi ile değiştirilmiştir.
12. Kolon üzerine 500 µl RNW Buffer eklenmiştir.
13. 10.000×g de 30 sn. santrifüjün ardından collection tüp yenisi ile değiştirilmiştir.
14. Kolon içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 10.000×g de 1 dk. santrifüj yapılmış ve kolon temiz bir tüpe alınmıştır.
15. Kolon üzerine 50 µl RNase-free su eklenerek 1 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.

16. Sonra 10.000×g de 1 dk. santrifüjün ardından elde edilen mRNA örnekleri -80°C sıcaklıkta dondurulmuştur.

cDNA Sentezi

1. mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezinde Wizbio markalı WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) isimli kit kullanılmıştır.
2. cDNA sentezi için 2 µl 10X Reaction Buffer, 1 µl 20X dNTP mix, 2 µl Random hexamer, 1 µl WizScript™ RTase, 0.5 µl RNase inhibitörü, 3.5 µl RNase free su ve 10 µl RNA örneği kullanılarak toplamda 20 µl hacminde mastermix çözeltisi hazırlanmıştır.
3. cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra revers transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan revers transkripsiyon reaksiyonunun koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları				
	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk.	120 dk.	5 dk.	-

4. Elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR aşamasına kadar -80°C sıcaklıkta dondurulmuştur.

Gerçek Zamanlı qPCR (RT-qPCR)

1. cDNA elde edildikten sonra gerçek zamanlı qPCR aşamasına geçilmiştir. Wizbio markalı WizPure™ qPCR Master (SYBR) isimli kit kullanılmıştır.
2. Tirozinaz gen ekspresyon analizi için kullanılan primer bilgileri aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Primer Adı	Primer Dizisi
hs-TYR-f	TCTTCTTGTTGCGGTGGGAA
hs-TYR-r	TGATGCTGGGCTGAGTAAGT
hs-actb-f	CATCCTCACCTGAAGTACC
hs-actb-r	TGAAGGTCTCAAACATGATCTG

3. 10 µl 2X MasterMix (with SYBR-Green), 1 µl ROX Dye, 1 µl Forward Primer (10 µM), 1 µl Reverse Primer (10 µM), 4 µl cDNA Template ve 3 µl RNase free distile kullanılarak toplamda 20 µl hacminde mastermix çözeltisi hazırlanmıştır.
4. Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. Real-Time qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Real-Time qPCR reaksiyonu QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System cihazında gerçekleştirilmiştir.

Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları			
PCR Adımı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Initial Denaturation	95	300 sn.	1
Denature	95	15 sn.	40
Anneal	55 - 68	60 sn.	

Relatif Kantitasyon Hesaplanması

mRNA ekspresyonları kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılıp kontrol gurubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta Ct$ Yöntemi” kullanılmıştır. $\Delta\Delta Ct$ hesaplaması aşağıda yer almaktadır.

1. Hem hedef grupta hem de referans grupta her bir örneğin hem hedef mRNA hem de referans mRNA için Real-Time PCR sonucunda Ct değerleri elde edilmiştir. Teknik tekrarlı çalışmalarda Ct değerlerinin ortalaması alınarak hesaplamaya devam edilmiştir.
2. Hedef grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak hedef grup ΔCt değerleri elde edilmiştir.
3. Referans grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak referans grup ΔCt değerleri elde edilmiştir.
4. Hedef grup ΔCt değerlerinden referans grup ΔCt değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri elde edilmiştir.
5. $\Delta\Delta Ct$ değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Fold Change) hesaplanması yapılmıştır.
6. Fold Change değeri 1'in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Fold Change değeri 1'in altında çıkması durumunda ise hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

3.6.5. Tirozinazın İmmunofloresan Olarak İşaretlenmesi

İmmunofloresans (IF), herhangi bir doku veya hücre tipinde neredeyse birçok bileşenin görselleştirilmesine izin veren bir tekniktir. Görselleştirme floroforlarla etiketlenmiş spesifik antikörlerin kombinasyonları yoluyla elde edilir. Hücre kültüründe veya hücre süspansiyonları üzerinde ve ayrıca doku numuneleri veya tüm organizmalardaki belirli hedefler üzerinde gerçekleştirilebilir. IF, çeşitli mikroskopi tekniklerini kullanarak, immünohistokimyaya kıyasla sinyalin mükemmel duyarlılığını ve amplifikasyonunu sağlar. Deneyin kapsamına veya kullanılan spesifik antikörlere bağlı olarak direkt veya indirekt IF olmak üzere iki tür IF yöntemi mevcuttur. Direkt IF yönteminde, florofor etiketi doğrudan hedef epitop ile reaksiyona girecek olan birincil antikora konjuge edilirken indirekt yöntem, iki aşamalıdır. Öncelik bir birincil antikor, hedef epitopa bağlanır, sonrasında florofor etiketli bir ikincil antikor, birincil antikoru tanıır ve ona bağlanır. Direkt IF yöntemi daha hızlı olmasına rağmen, indirekt IF yöntemi yüksek hassasiyeti, sinyal amplifikasyonu ve aynı örnekte birden fazla hedefi tespit edebilmesi nedeniyle daha yaygın olarak kullanılmaktadır (141,142).

Bu tez çalışmasında tirozinaz enziminin IF görüntülemesi için indirekt IF yöntemi kullanılmıştır. Primer antikor olarak tirozinaz antikoru (T311) kullanılmıştır. Tirozinaz Antikoru (T311), insan kaynaklı rekombinant tirozinaz'a karşı geliştirilen fare monoklonal IgG_{2aκ} tirozinaz antikordur. Fare, sıçan ve insan kaynaklı tirozinazın Western Blot, immunfloresan boyama gibi yöntemlerle tespit edilmesinde kullanılır (143). Sekonder antikor olarak ise Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC) (ab6785) antikoru kullanılmıştır. Sekonder antikor immunfloresan boyama için floresein izotiyosiyanat (FITC) ile konjuge haldedir (144).

Yöntemin Uygulanışı

1. Hücreler negatif kontrol, kontrol, metformin, askorbik asit ve metformin + askorbik asit gruplarını oluşturacak şekilde 8 kuyucuklu lamlara ekilmiştir. Metformin grubuna 50 µm metformin, askorbik asit grubuna 0,5 µm askorbik asit ve metformin+ askorbik asit grubuna 50 µm

metformin+0,5 µm askorbik asit uygulanmıştır. Hücreler dozlandıktan 1 gün sonra kuyucuklarda yer alan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılıp PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

2. Fiksasyon işlemi için hücreler oda sıcaklığında 15 dk % 4 paraformaldehit çözeltisi ile muamele edilmiştir.
3. Fiksasyonun ardından hücreler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır.
4. Permeabilizasyon için hücreler oda sıcaklığında 10 dk boyunca % 0,1 Triton X-100 ile muamele edilmiştir.
5. Permeabilizasyonun ardından hücreler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır.
6. Hücrelerin üzerine oda sıcaklığında Goat Serum (1/200) içeren blocking solüsyonu eklenmiştir ve 30 dk boyunca bekletilmiştir.
7. Blocking serum uzaklaştırıldıktan sonra % 2,5 BSA-PBS ile 1:200 oranında seyreltilen tirozinaz antikoru (T311) (sc-20035, Santa cruz) kuyucuklara eklenmiştir. Bu işlem negatif kontrol grubu dışında bütün gruplar için gerçekleştirilmiştir. Primer antikor (tirozinaz antikoru (T311)) eklenen hücreler + 4°C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.
8. Primer antikorla 1 gece inkübe edilen hücreler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır.
9. Sekonder antikor olarak %1 NHS ile 1:500 oranında seyreltilen Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC) (ab6785, Abcam) antikor hücrelerin üzerine eklenerek 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir.
10. Sekonder antikorla 1 saat muamele edildikten sonra hücreler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır.

11. Yıkanan hücrelerin çekirdeklerini boyamak amacıyla hücrelerin üzerine 10 µm DAPI (4',6-diamidino-2- phenylindole) eklenmiştir.
12. DAPI uygulandıktan sonra floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Leica) ve kamera/görüntü analiz sistemi kullanılarak her bir gruptaki hücrelerin floresansları görüntülenmiştir.

İmmunfloresan intensite ölçümü

Deney gruplarında Image Processing and Analyzis in Java (Image J, ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) ve Optik ve Hesaplamalı Enstrümantasyon Laboratuvarı) analiz programı kullanılarak immunfloresan intensite (yoğunluk) ölçümü yapılmıştır. Bunun için X40 büyütmede 5 alanda her alanda 40 hücre işaretlenerek her grup için “düzeltilmiş total hücre floresan (CTCF)” hesaplaması “CTCF= Int Den - (Arka plan intensitesinin ortalaması X Hücre alanı)” formülü kullanılarak yapılmıştır. Her grup için ortalama hesaplanarak GraphPad prism programında grafikleri çizilerek analizi yapılmıştır.

3.6.6. Melanin Oluşumunun Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Melanin miktarının belirlenmesinde sandviç ELISA prensibini kullanan bir insan melanin ELISA kiti kullanılmaktadır. Melanin kitinde bulunan mikro ELISA plakası, insan melanin monoklonal antikoru ile önceden kaplanmıştır. Melanin içeren numunelerin üzerine biyotinle işaretlenmiş melanin antikoları ve Streptavidin HRP konjugat reaktifi eklendiğinde bir immün kompleks oluşur. İnkübasyon ve yıkama işlemlerinin ardından Kromojen Solüsyonu A ve Kromojen Solüsyonu B eklendiğinde mavi renkte çözeltiler elde edilir. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır. Stop solüsyonun eklenmesini takiben asidite nedeniyle mavi renk sarı renge döner. Bu renk değişimi, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı

1. 0 ng/ml, 7,5 ng/ml, 15 ng/ml, 30 ng/ml, 60 ng/ml ve 120 ng/ml standart çalışma solüsyonları solüsyonun her konsantrasyonu, her bir kuyucuğa, yan yana her kuyu için 50 µl olacak şekilde iki kopya halinde plağın ilk sırasına eklenmiştir. Ardından 50 µl Streptavidin HRP konjugat reaktifi eklenmiştir. Standart çözeltilerin içerisinde biyotinle işaretlenmiş melanin antikorunu yer aldığından bu çözelti standart ve kör çözeltilerin yer aldığı kuyulara eklenmemiştir.
2. Numunelerin yer alacağı kuyucuklara 40 µl numune, 10 µl biyotinle işaretlenmiş melanin antikor çözeltisi ve 50 µl Streptavidin HRP konjugat reaktifi eklenmiştir. Plaka, kitte bulunan plaka kapatici ile örtülerek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
3. Çözelti her bir kuyucuktan aspire edilmiş ve her kuyucuğa 350 µl yıkama tamponu eklenmiştir. 1-2 dakika beklendikten sonra solüsyon her bir kuyucuktan aspire edilmiş ve temiz emici kâğıda hafifçe vurarak kurutulmuştur. Bu yıkama adımı 5 kez tekrarlanmıştır.
4. Her bir kuyucuğa 50 µl Kromojen Solüsyon A ve 50 µl Kromojen Solüsyon B eklenmiş ve 37°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Bu aşamada çözeltiler mavi renklidir. Kromojen Solüsyon B ışığa hassas olduğu için bu aşamada plağın ışıktan korunmasına dikkat edilmiştir.
5. Enzim-substrat reaksiyonu, her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmıştır. Stop solüsyonun asidik olması nedeniyle mavi renkteki çözeltiler sarı renge dönmüştür.
6. Kör çözeltinin yer aldığı kuyucuğun absorbansı 0 kabul edilerek standart çözeltilerdeki ve numunelerdeki melanin miktarı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Melanin Düzeyinin Belirlenmesi

Her standart ve numune için çift okumaların ortalaması alınarak x ekseninde melanin konsantrasyonu ve y ekseninde optik yoğunluk değerleri ile bir sigmoidal eğri çizilmiştir.

3.6.7. cAMP Oluşumunun Belirlenmesi

Yöntemin Esası

cAMP oluşumunun belirlenmesinde kompetitif ELISA prensibini kullanan bir ELISA kiti kullanılmaktadır. cAMP kitinde bulunan mikro ELISA plakası, cAMP ile önceden kaplanmıştır. Reaksiyon sırasında, numunedeki veya standarttaki cAMP, cAMP'ye özgü Biotinlenmiş Saptama Ab üzerindeki siteler için katı faz destekçisi üzerindeki sabit miktarda cAMP ile rekabet eder. Fazla konjugat ve bağlanmamış numune veya standart plakadan yıkanır ve her mikropalak kuyusuna Horseradish Peroxidase (HRP) konjuge Avidin eklenir ve inkübe edilir. Daha sonra her kuyucuğa bir TMB substrat solüsyonu eklenir. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve renk değişimi, 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki cAMP konsantrasyonu daha sonra numunelerin optik yoğunluğu standart eğri ile karşılaştırılarak belirlenir (138).

Yöntemin Uygulanışı

1. Standart çalışma solüsyonu ilk iki sütuna eklenmiştir. Solüsyonun her konsantrasyonu, her bir kuyucuğa, yan yana her kuyucuk için 50 μ l olacak şekilde iki kopya halinde eklenmiştir. Örnekler her kuyucuk için 50 μ l olacak şekilde diğer kuyucuklara eklenmiştir. Her kuyucuğa hemen 50 μ l biyotinlenmiş tespit Ab çalışma solüsyonu eklenmiştir. Plaka, kitte bulunan plaka kapatici ile örtülerek 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. Solüsyonların mikro ELISA plakasındaki kuyucukların dibine eklenmesine dikkat edilmiş ve mümkün olduğunca iç duvara dokunmaktan ve köpürmeye neden olmaktan kaçınılmıştır.

2. Çözelti her bir kuyucuktan aspire edilmiş ve her kuyucuğa 350 µl yıkama tamponu eklenmiştir. 1-2 dakika beklendikten sonra solüsyon her bir kuyudan aspire edilmiş ve temiz emici kağıda hafifçe vurarak kurutulmuştur. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlanmıştır.
3. Her kuyucuğa 100 µl HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklenmiş ve plaka kapatıcı ile örtülerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. Çözelti her bir kuyucuktan aspire edilerek 2. adımda gerçekleştirildiği gibi yıkama işlemi beş kez tekrarlanmıştır.
5. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenmiş ve plaka yeni bir plaka kapatıcı ile örtülerek 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu adımda plaka ışıktan korunmuştur. Reaksiyon süresi, gerçek renk değişimine göre kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak sürenin 30 dakikadan fazla olmamasına dikkat edilmiştir.
6. Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir. Durdurma solüsyonunun eklenmesi işlemi, substrat solüsyonuyla aynı sırada yapılmıştır.
7. 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile her bir kuyucuğun optik yoğunluğu ölçülmüştür.

cAMP Düzeyinin Belirlenmesi

Her standart ve numune için çift okumaların ortalaması alınarak X ekseninde standart konsantrasyon ve y ekseninde optik yoğunluk değerleri ile log-log ekseninde dört parametrelili bir lojistik eğri çizilmiştir (138).

3.6.8. L-DOPA Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

L-DOPA miktarının belirlenmesinde sandviç ELISA prensibini kullanan bir L-DOPA ELISA kiti kullanılmaktadır. L-DOPA kitinde bulunan mikro ELISA plakası, insan L-DOPA monoklonal antikoru ile önceden kaplanmıştır. L-DOPA içeren numunelerin üzerine biyotinle işaretlenmiş L-DOPA antikoru ve Streptavidin HRP konjugat reaktifi eklendiğinde bir immün kompleks oluşur. İnkübasyon ve yıkama işlemlerinin ardından Chromogen Solüsyonu A ve Chromogen Solüsyonu B eklendiğinde mavi renkte çözeltiler elde edilir. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır. Stop solüsyonun eklenmesini takiben asidite nedeniyle mavi renk sarı renge döner. Bu renk değişimi, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı

1. 0 ng/ml, 7,5 ng/ml, 15 ng/ml, 30 ng/ml, 60 ng/ml ve 120 ng/ml standart çalışma solüsyonları solüsyonun her konsantrasyonu, her bir kuyucuğa, yan yana her kuyu için 50 µl olacak şekilde iki kopya halinde plağın ilk sırasına eklenmiştir. Ardından 50 µl Streptavidin HRP konjugat reaktifi eklenmiştir. Standart çözeltilerin içerisinde biyotinle işaretlenmiş L-DOPA antikoru yer aldığından bu çözelti standart ve kör çözeltilerin yer aldığı kuyulara eklenmemiştir.
2. Numunelerin yer alacağı kuyulara 40 µl numune, 10 µl biyotinle işaretlenmiş L-DOPA antikor çözeltisi ve 50 µl Streptavidin HRP konjugat reaktifi eklenmiştir. Plaka, kitte bulunan plaka kapatıcı ile örtülerek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
3. Çözelti her bir kuyudan aspire edilmiş ve her kuyuya 350 µl yıkama tamponu eklenmiştir. 1-2 dakika beklendikten sonra solüsyon her bir

kuyudan aspire edilmiş ve temiz emici kağıda hafifçe vurarak kurutulmuştur. Bu yıkama adımı 5 kez tekrarlanmıştır.

4. Her bir kuyucuğa 50 µl Kromojen Solüsyon A ve 50 µl Kromojen Solüsyon B eklenmiş ve 37°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Bu aşamada çözeltiler mavi renklidir. Chromogen Solüsyon B ışığa hassas olduğu için bu aşamada plağın ışıktan korunmasına dikkat edilmiştir.
5. Enzim-substrat reaksiyonu, her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmıştır. Stop solüsyonun asidik olması nedeniyle mavi renkteki çözeltiler sarı renge dönmüştür.
6. Kör çözeltilerin yer aldığı kuyunun absorbansı 0 kabul edilerek standart çözeltilerdeki ve numunelerdeki L-DOPA miktarı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

L-DOPA Düzeyinin Belirlenmesi

Her standart ve numune için çift okumaların ortalaması alınarak x ekseninde L-DOPA konsantrasyonu ve y ekseninde optik yoğunluk değerleri ile bir lojistik eğri çizilmiştir.

3.6.9. Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Yöntemin Esası

Biyolojik numunelerdeki protein miktarını tahmin etmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri Lowry Yöntemidir. Bu deneyde protein tayini için Lowry yönteminin modifikasyonu kullanılmıştır. Yöntemin esası alkalın koşullar altında peptit nitrojenlerinin bakır [II] iyonları ile reaktivitesinde ve ardından Folin-Ciocaltey'in indirgenmesine dayanmaktadır.

Yöntemin Uygulanışı

1. ELISA plak kuyucuklarına 40 µl deiyonize su, albümin standart çözeltileri ve numuneler pipet yardımıyla aktarılmıştır.
2. Kuyucukların üzerine deneyden önce taze hazırlanan 40 µl bakır reaktifi ilave edilir. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.
3. Kuyucuklara 120 µl folin fenol çözeltisi ilave edilir. 50°C'lik su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir.
4. Spektrofotometre yardımıyla 540 nm'de absorbanslar okunmuştur.

Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Kalibrasyon doğrusu denklemi ile kör çözelti, albümin standartları ve numunedeki protein miktarı kıyaslanarak hesaplanmıştır.

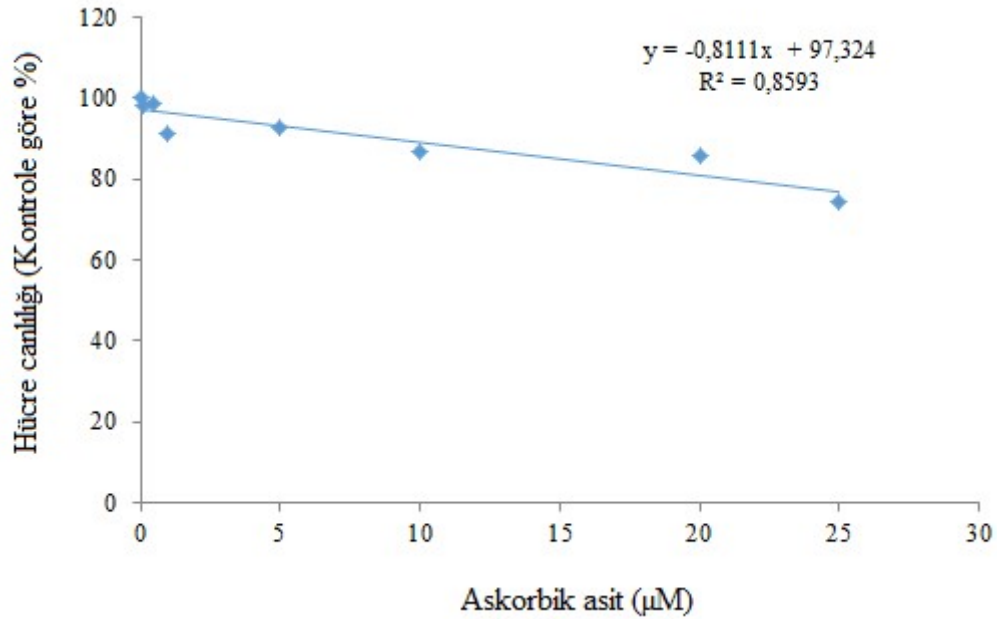
3.6.10. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS 17.0 (Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılmış ve gruplar arasındaki fark Student t testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiş, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Image J programı ile yapılan intensite ölçümlerinde her grup için ortalama CTCF saptanmıştır. Veriler ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) olarak verilmiş, $p < 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

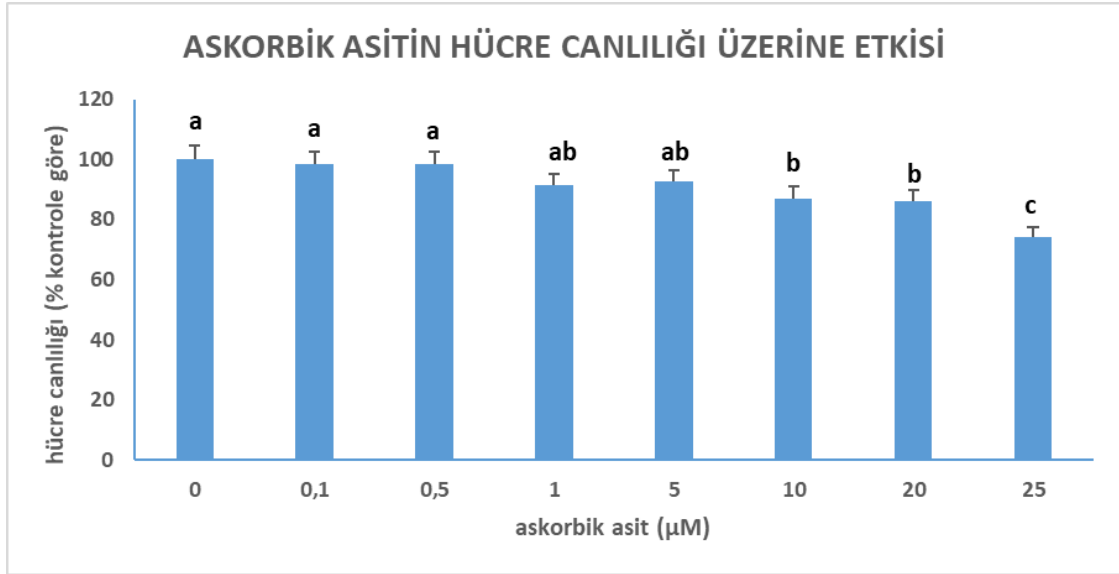
4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemi İle Sitotoksitenin Belirlenmesi

MNT-1 hücrelerinde askorbik asit ve metformin hidroklorür çözeltilerinin sitotoksitesi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. MNT-1 hücrelerine besiyeri içerisinde hazırlanmış 0,1-25 μM konsantrasyon aralığında askorbik asit çözeltisi ve 50-5000 μM konsantrasyon aralığında metformin hidroklorür çözeltisi uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak ise hücrelere sadece besiyeri uygulanmıştır. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin ortalaması, %100 canlılık değeri olarak kabul edilerek her bir doz için hücre canlılığı hesaplanmıştır. (Tablo 4.1., Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.)

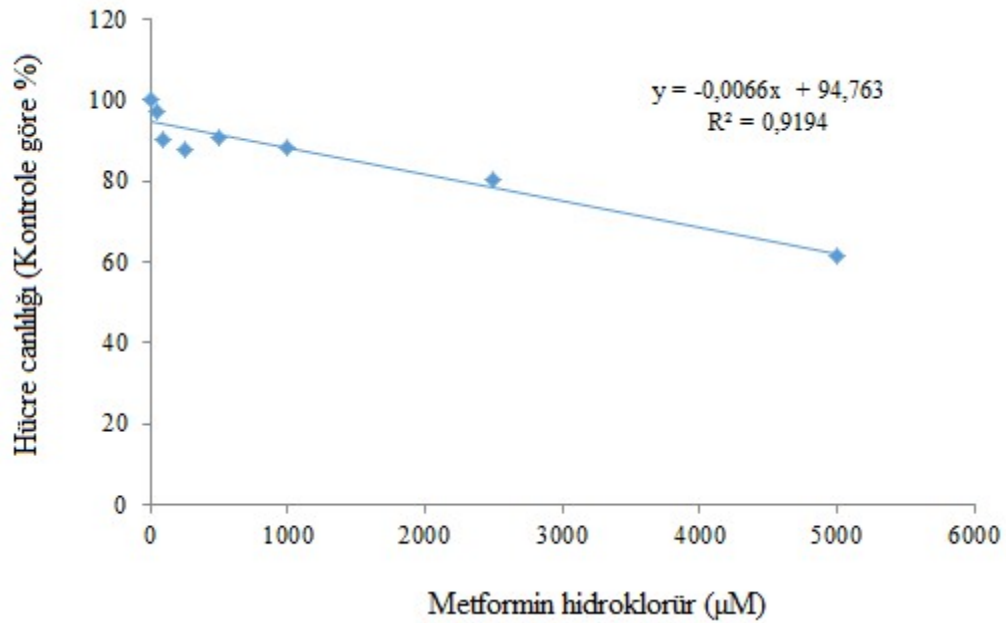


Şekil 4.1. Askorbik asitin 0,1-25 μM konsantrasyon aralığında MNT-1 hücre canlılığı üzerine etkisi

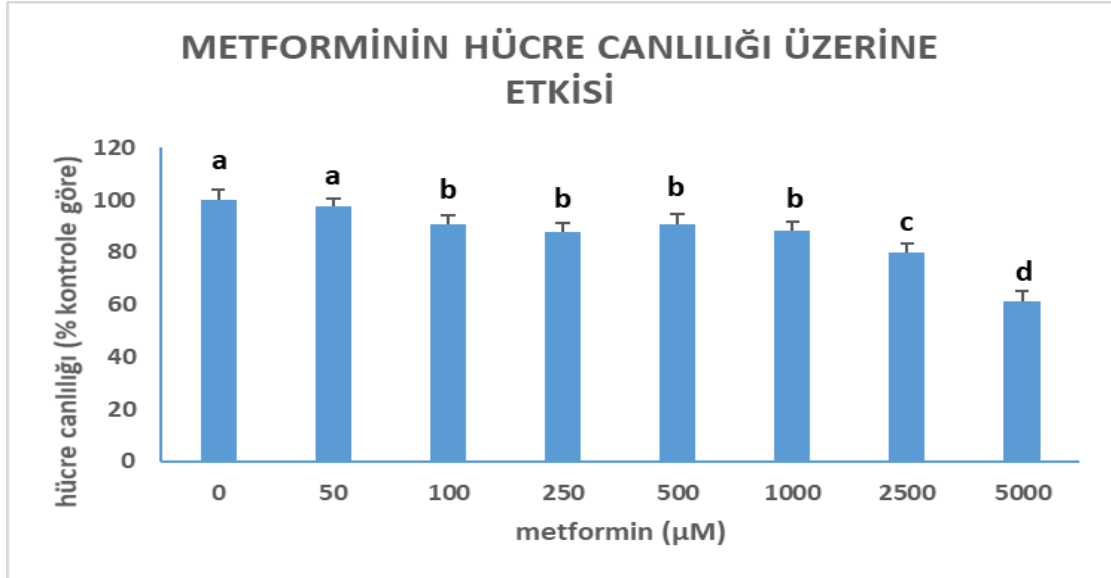


Şekil 4.2. Askorbik asitin 0,1-25 µM konsantrasyon aralığında MNT-1 hücre canlılığı üzerine etkisi

^{a,b,c}Farklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.3. Metformin hidroklorürün 50-5000 µM konsantrasyon aralığında MNT-1 hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.4. Metformin hidroklorürün 50-5000 µM konsantrasyon aralığında MNT-1 hücre canlılığı üzerine etkisi

^{a,b,c,d}Farklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

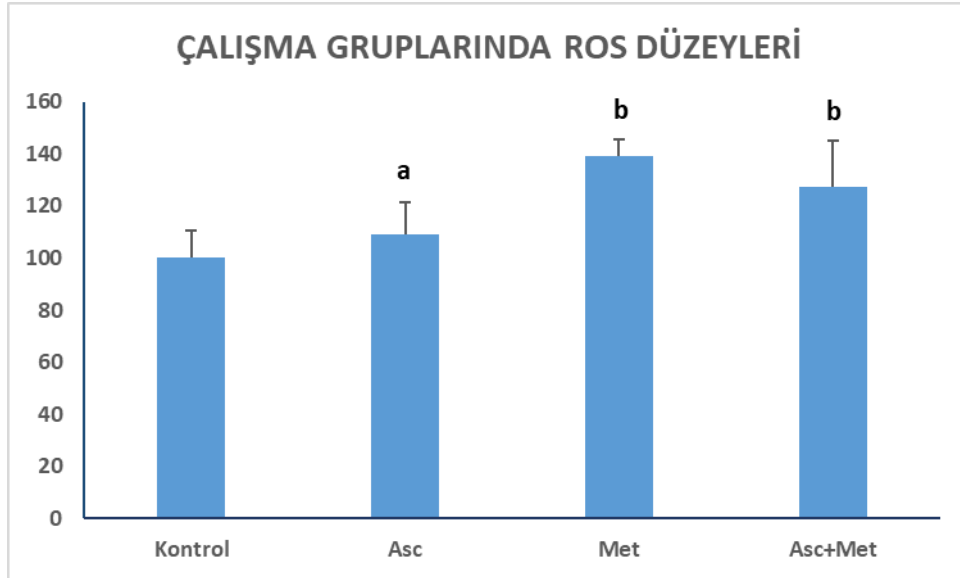
Tablo 4.1. MNT-1 Hücrelerinde Askorbik Asit ve Metformin Hidroklorürün Dozları

Askorbik Asit	Metformin Hidroklorür
0,5 µM	50 µM

*Sonnuçlar 3 farklı zamanda, gün içi 2 ayrı tekrar ile yapılan çalışmaların ortalama değeriştir.

4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Belirlenmesi

Çalışma gruplarındaki ROS düzeyleri Şekil 4.5.'te ve Tablo 4.2.'de verilmiştir. Askorbik asit uygulanan grupta ROS düzeyleri kontrole göre %8,97 oranında artarken ($p > 0,05$), metformin uygulaması ROS düzeylerini %39,12 ($p < 0,05$) ve kombine uygulama ROS düzeylerini %27,35 artırmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 4.5.Çalışma gruplarında ROS düzeyleri.

^{a,b}Farklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

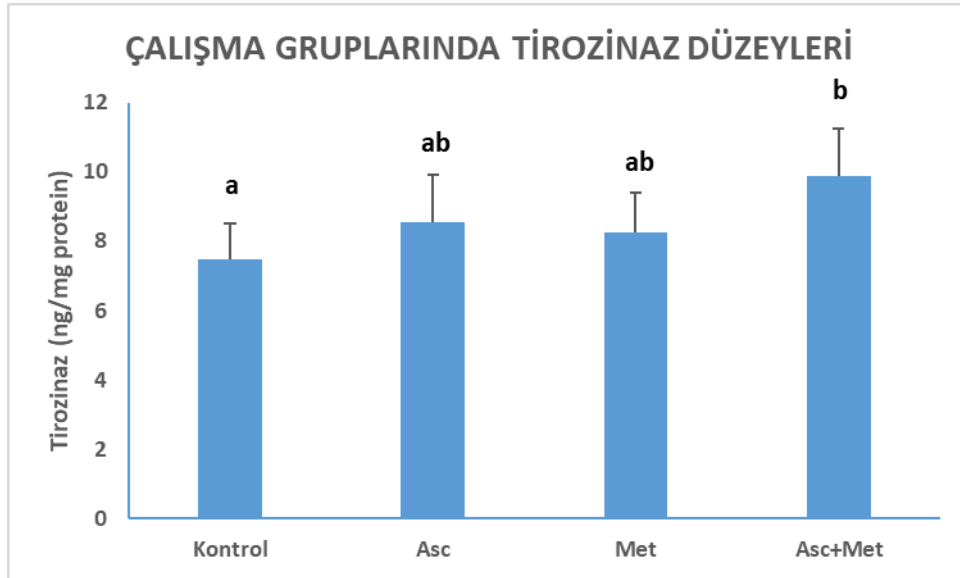
Tablo 4.2. Çalışma gruplarında ROS düzeyleri.

	ROS düzeyleri (% kontrole göre)
Kontrol	100±10,69 ^a
Asc	108,97±12,66 ^a
Met	139,12±6,56 ^b
Asc+Met	127,35±17,63 ^b

^{a,b}Farklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

4.3. Tirozinaz Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışma gruplarındaki tirozinaz düzeyleri Şekil 4.6.'da ve Tablo 4.3.'te verilmiştir. Buna göre, askorbik asit uygulaması ile tirozinaz düzeyleri kontrole göre %13,93, metformin uygulaması ile %10,14 ve kombine uygulama ile %32 artmıştır. Kombine uygulama ile kontrol grubu arasında tirozinaz düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmiştir (p<0,05).



Şekil 4.6.Çalışma gruplarında tirozinaz düzeyleri.

^{a,b}Farklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

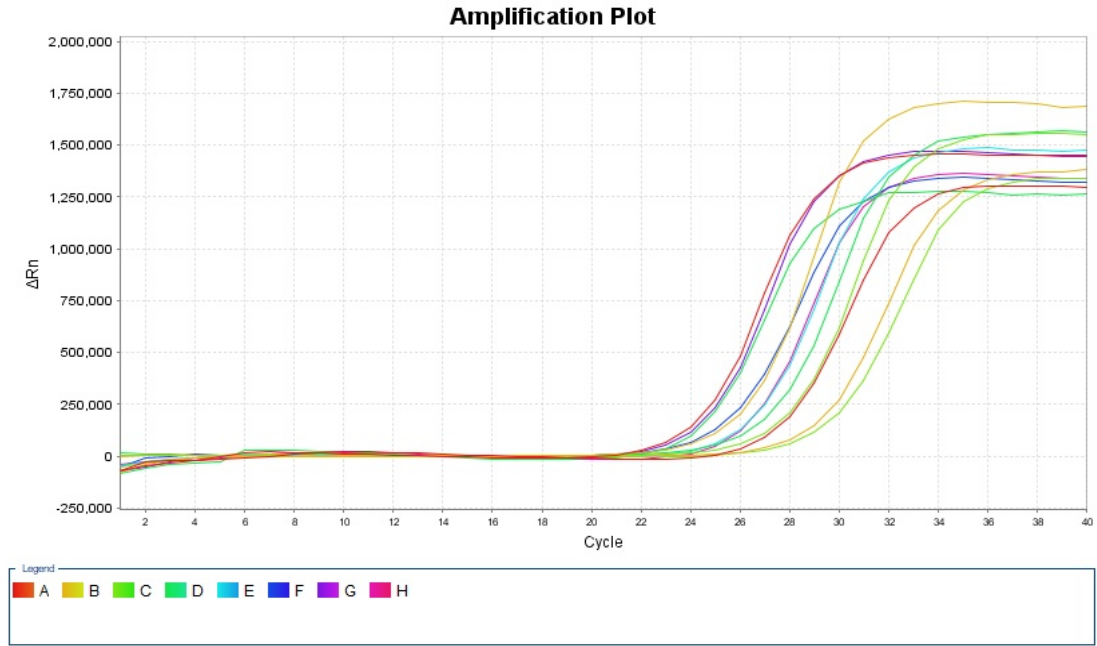
Tablo 4.3. Çalışma gruplarında tirozinaz düzeyleri.

	Tirozinaz düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	7,50±1,01 ^a
Asc	8,54±1,39 ^{ab}
Met	8,26±1,13 ^{ab}
Asc+Met	9,90±1,36 ^b

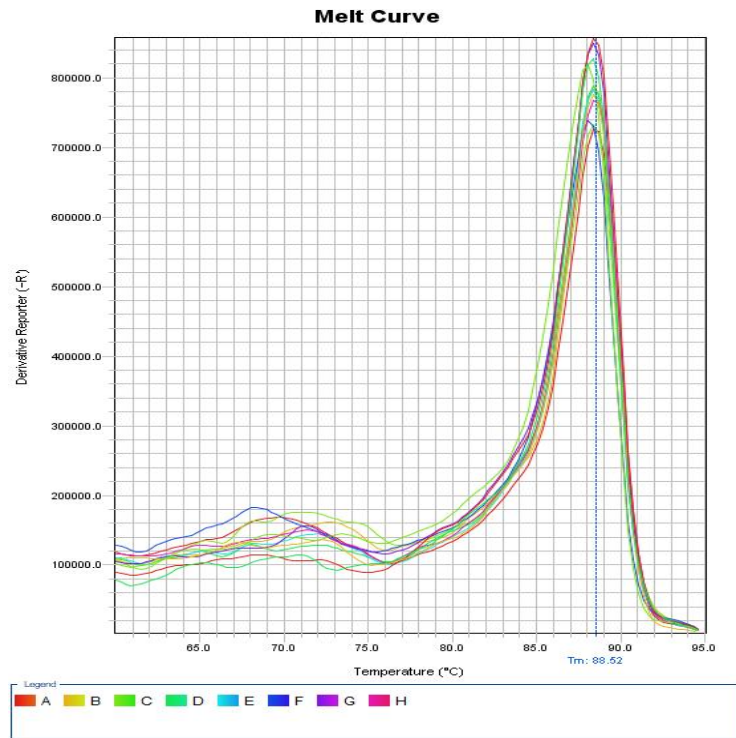
^{a,b}Farklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

4.4. Tirozinaz Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi

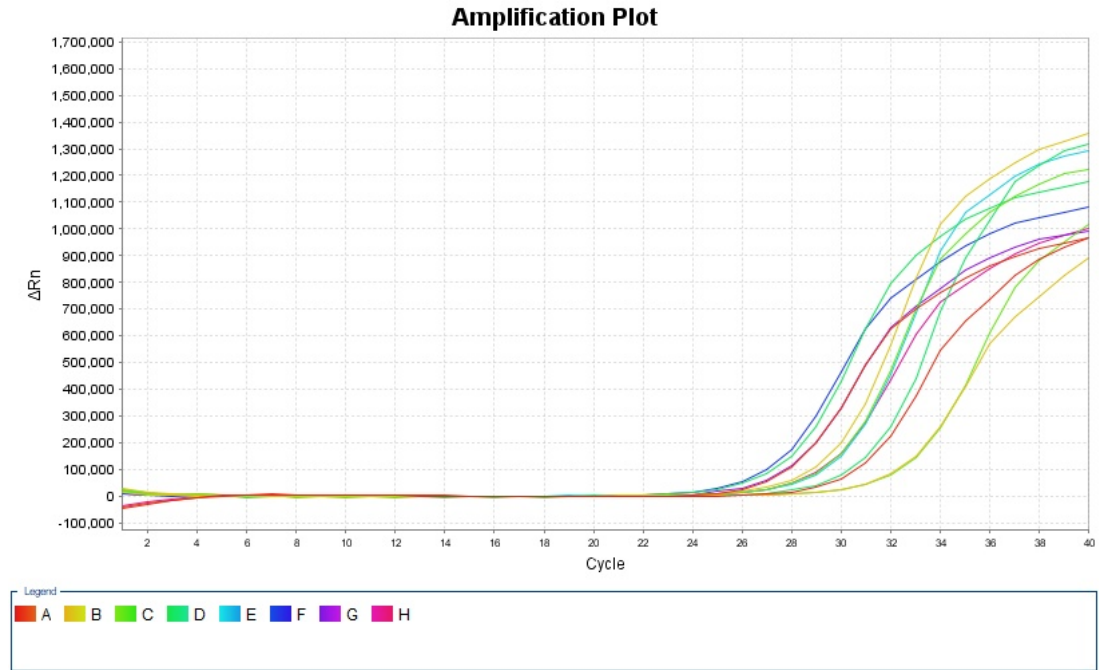
Çalışma gruplarındaki β -aktin amplifikasyon ve erime grafikleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. Çalışma gruplarındaki tirozinaz amplifikasyon ve erime grafikleri sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da verilmiştir. Çalışma gruplarında tirozinaz gen ekspresyon değişimi Şekil 4.11 ve Tablo 4.4’te gösterilmiştir. Askorbik asit tirozinaz gen ekspresyonunu %11 azaltırken, metformin %3 arttırmıştır. Kombine uygulama ile tirozinaz gen ekspresyonu %30 artmıştır.



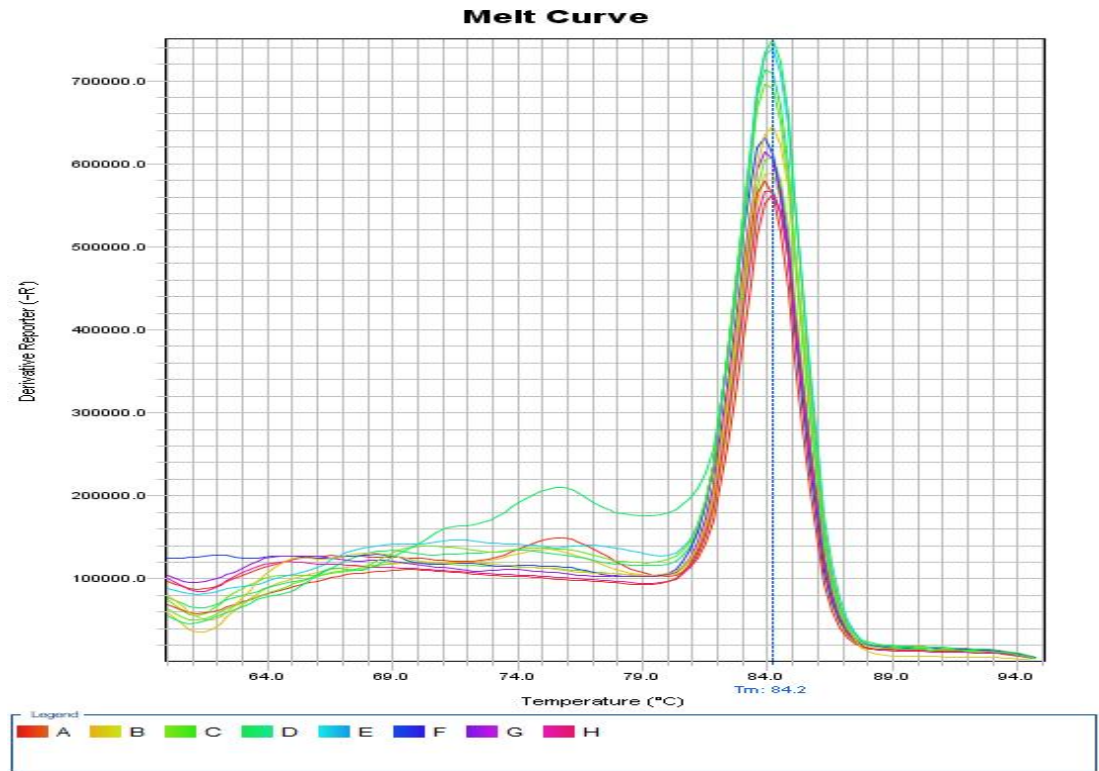
Şekil 4.7. β -aktin amplifikasyon grafiği.



Şekil 4.8. β -aktin erime grafiği.

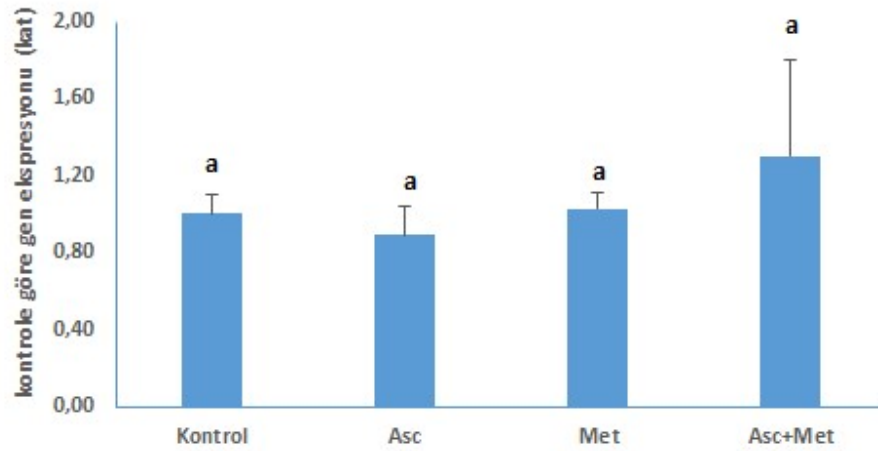


Şekil 4.9. Tirozinaz amplifikasyon grafiği.



Şekil 4.10. Tirozinaz erime grafiği.

ÇALIŞMA GRUPLARINDA TİROZİNAZ GEN EKSPRESYONU



Şekil 4.11. Çalışma gruplarında tirozinaz gen ekspresyon düzeyleri.

^aFarklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.4. Çalışma gruplarında tirozinaz gen ekspresyon düzeyleri.

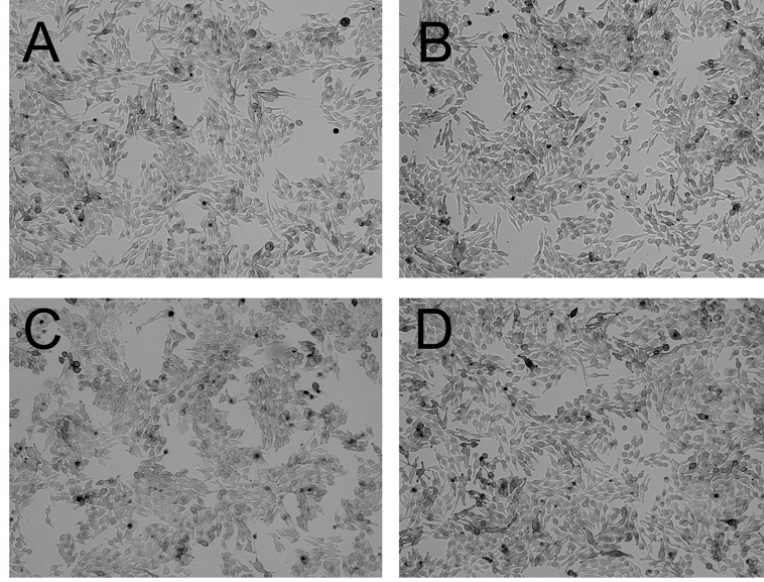
	Tirozinaz gen ekspresyonu (kontrolle göre kat)
Kontrol	1,00±0,10 ^a
Asc	0,89±0,15 ^a
Met	1,03±0,08 ^a
Asc+Met	1,30±0,50 ^a

^{a,b}Farklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

4.5. Sitopatoloji

Deney gruplarına ait örneklerin faz kontrast mikroskop altında incelemesinde flask tabanına tutunan, fibroblast benzeri iğsi görünümde MNT-1 hücreleri izlenmiştir. Deney grupları benzer sayıda hücre içermekteydi. MNT-1 hücrelerinin ökromatik çekirdekleri, çekirdek çevresinde sitoplazmada yer yer koyu granüller ve bu granüller nedeniyle sitoplazmanın kahverengi, siyah pigmente görünümde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12., 4.13., 4.14 ve 4.15). Kontrol grubunda sitoplazmasında kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücreleri çoğunlukta idi. Askorbik asit ve metformin uygulanan gruplarda kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücreleri kontrole kıyasla daha az olarak izlenmiştir. Askorbik asit ve metforminin beraber uygulandığı kombine grupta kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1

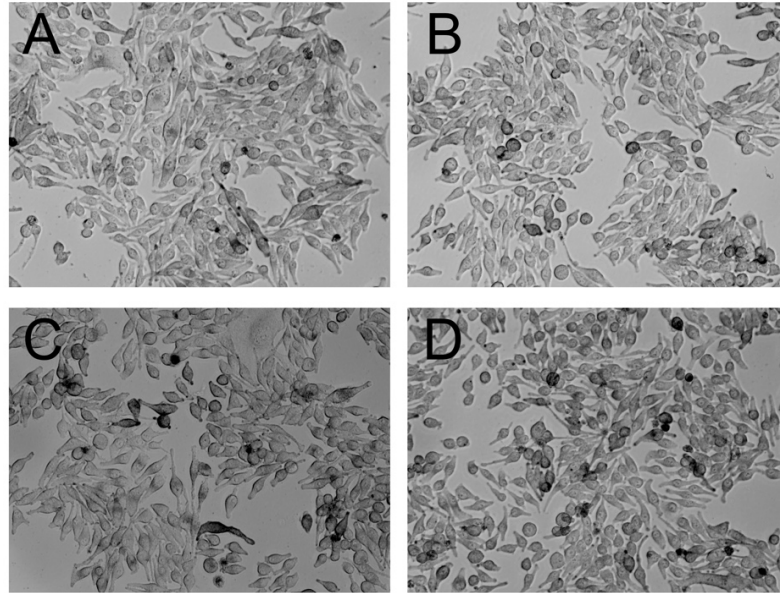
hücreleri kontrol grubu ile benzer yoğunlukta izlenmiştir (Şekil 4.15.). Metformin grubunda bölünemeyen büyük sitoplazmalı hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.13C).



Şekil 4.12. Deney gruplarının faz kontrast mikroskop görüntüsü.

Deney grupları benzer sayıda tutunan, fibroblast benzeri hücre içermektedir.

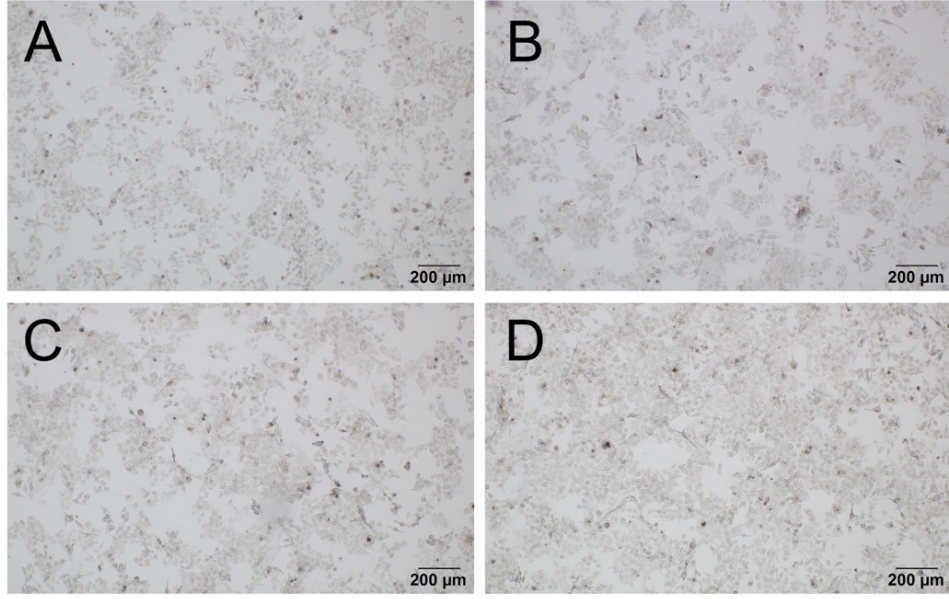
A: Kontrol, B: Askorbik asit, C: Metformin, D: Kombine uygulama (Asc+Met)(Faz kontrast X100)



Şekil 4.13. Deney gruplarının daha büyük büyütmesinde flask tabanına tutunan iğsi MNT-1 hücreleri.

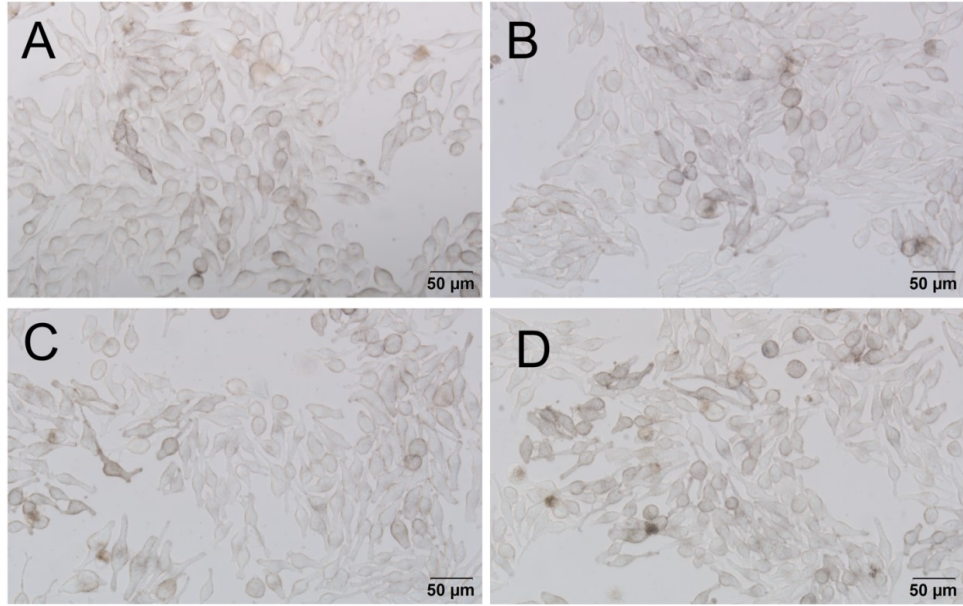
Hücreler ökromatik çekirdekleri ve çekirdek çevresinde koyu renkli sitoplazmaları ile izlenmektedir.

Metformin grubunda bölünememiş büyük bir hücre izlenmektedir. A: Kontrol, B: Askorbik asit, C: Metformin, D: Kombine uygulama (Asc+Met) (Faz kontrast X200)



Şekil 4.14. Deney gruplarının faz kontrast mikroskop görüntüsü.

Deney grupları benzer sayıda tutunan, fibroblast benzeri iğsi ve pigmente hücreler içermektedir. A: Kontrol, B: Askorbik asit, C: Metformin, D: Kombine uygulama (Asc+Met)(Faz kontrast X100)

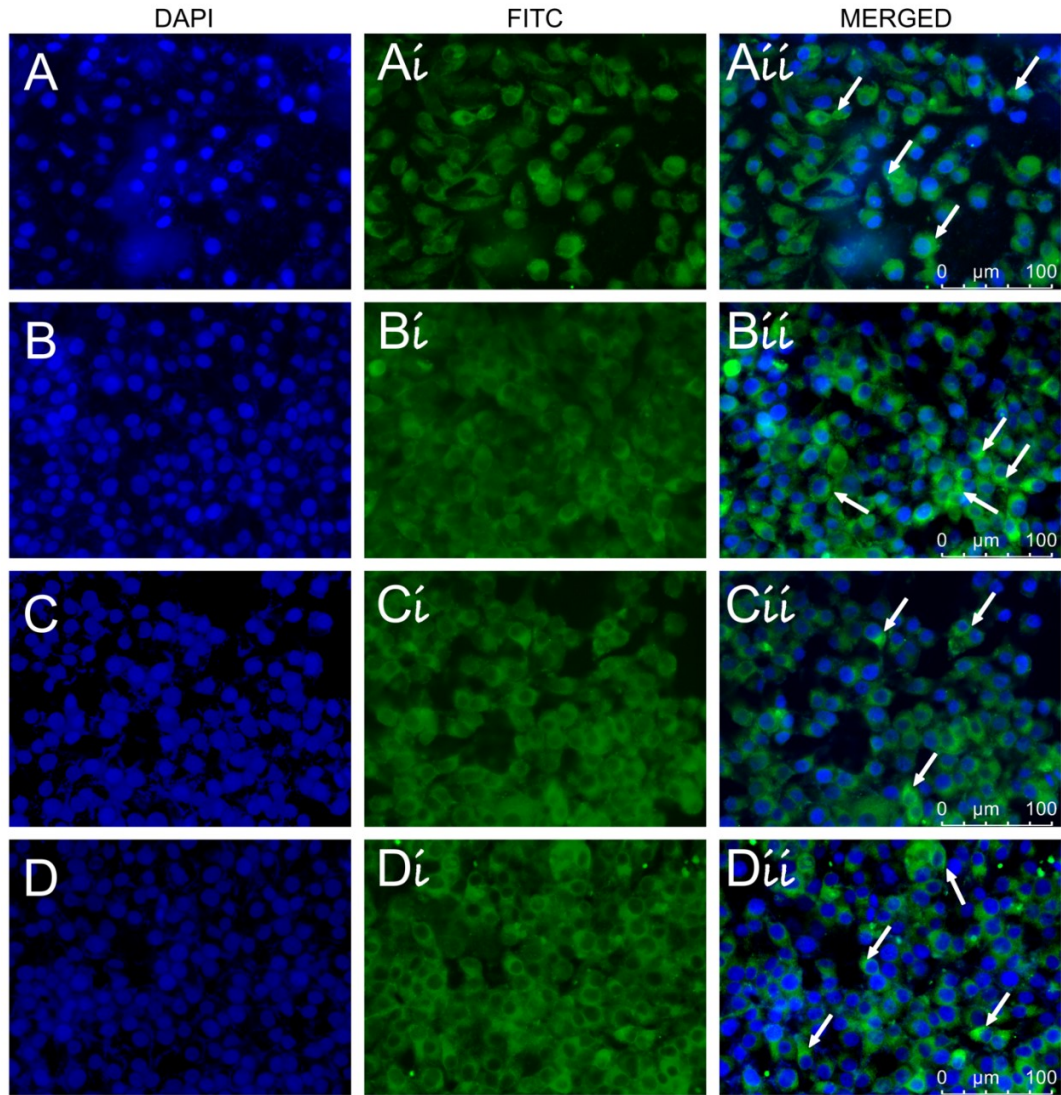


Şekil 4.15. Deney gruplarının daha büyük büyütmesinde faz kontrast mikroskop görüntüsü.

Deney gruplarının daha büyük büyütmesinde çekirdek çevresinde sitoplazmada kahverengi granüller (melanin) ile pigmente hücre özelliğinde MNT-1 hücreleri gözlenmektedir. Kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücreleri askorbik asit ve metformin uygulanan gruplarda kontrole kıyasla daha az olarak izlenirken kombine grupta kontrol grubu ile benzer yoğunlukta izlenmiştir. A: Kontrol, B: Askorbik asit, C: Metformin, D: Kombine uygulama (Asc+Met) (Faz kontrast X400)

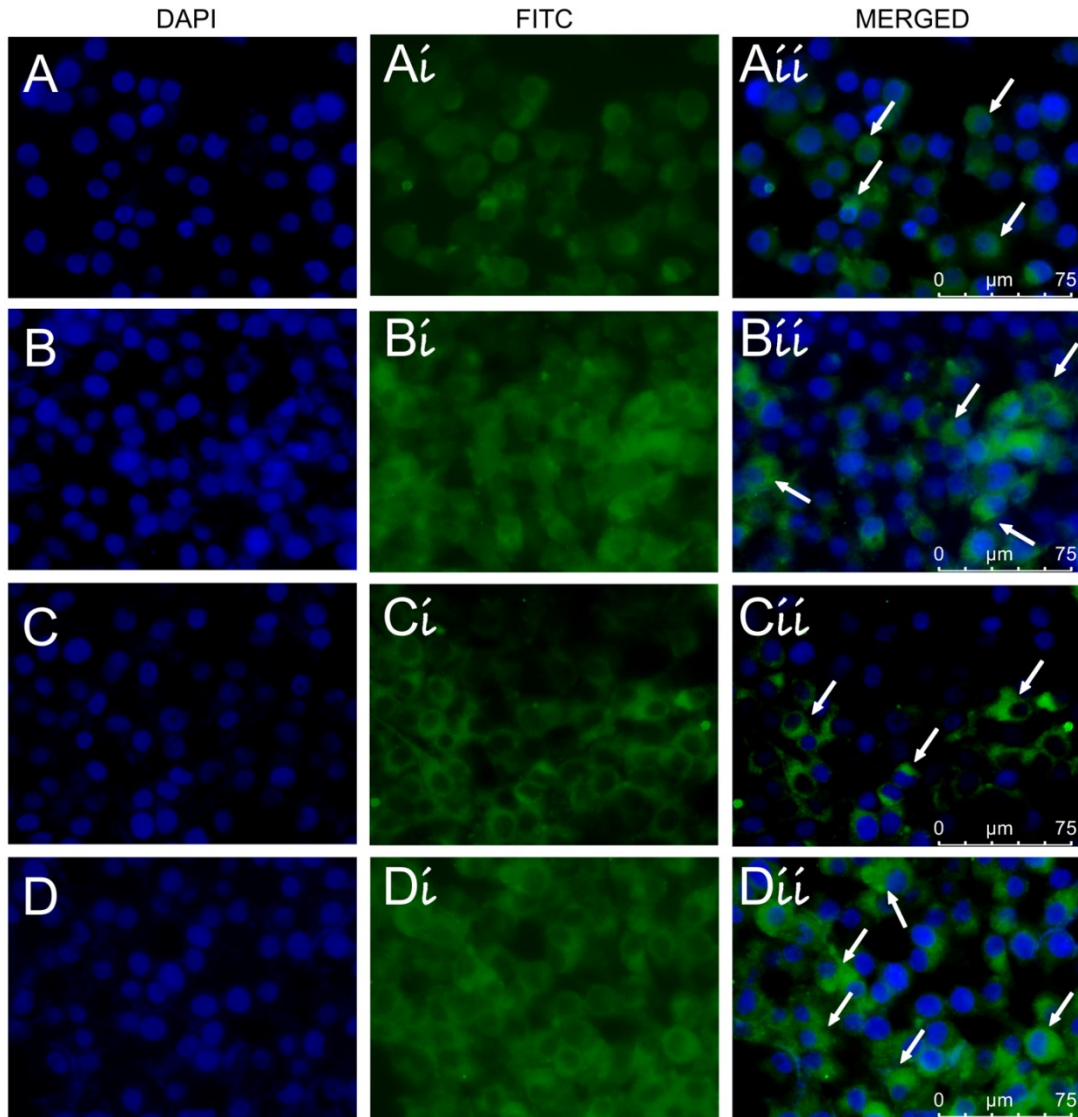
4.6. Tirozinazın İmmünfloresan Olarak İşaretlenmesi

Anti-tirozinaz ile yapılan indirekt immunfloresan işaretlemeye deney gruplarında MNT-1 hücrelerinde sitoplazmada granüler, noktasal işaretlenmeler izlenmiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17.). Askorbik asit uygulanan grupta immunfloresan incelemede çok sayıda mitotik hücre izlenmiştir.



Şekil 4.16. Deney gruplarında anti-tirozinaz ile indirekt immunfloresan işaretleme.

Anti-tirozinaz ile yapılan işaretlemeye hücrelerin sitoplazmalarında anti-tirozinaz ile pozitif immunreaktivite (yeşil) (ok) izlenmektedir. A: Kontrol, B: Askorbik asit, C: Metformin, D: Kombine uygulama (Asc+Met) i: FITC, ii: Birleştirilmiş, X400

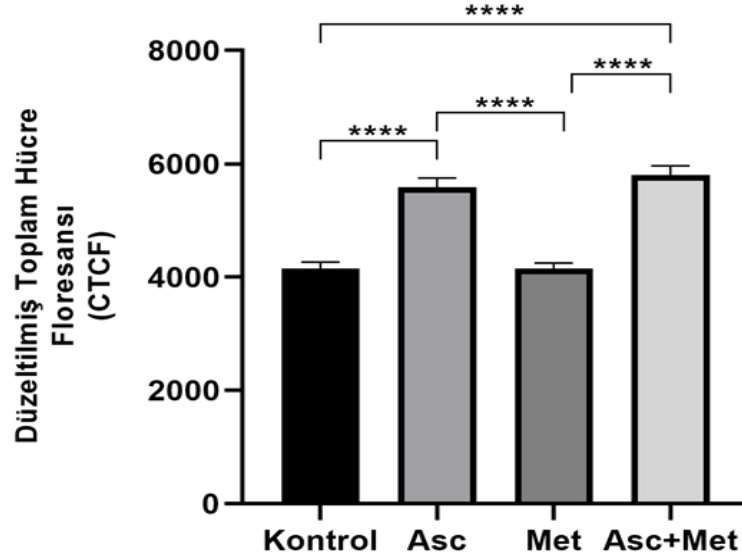


Şekil 4.17. Deney gruplarında anti-tirozinaz ile indirekt immunfloresan işaretlemeye ait görüntülerin daha büyük büyütmesi.

MNT-1 hücrelerinin sitoplazmalarında tirozinaz pozitif granüler alanlar (ok) izlenmektedir. A: Kontrol, B: Askorbik asit, C: Metformin, D: Kombine uygulama (Asc+Met) i: FITC, ii: Birleştirilmiş, X630

Image J programı ile yapılan intensite ölçümlerinde her grup için ortalama CTCF saptanmıştır. Gruplar CTCF açısından karşılaştırıldığında Asc ve Asc+Met gruplarında ortalama CTCF'nin kontrole göre daha yüksek olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,0001$) belirlenmiştir. Ayrıca Asc ve Asc+Met grupları Met grubu ile karşılaştırıldığında Asc ve Asc+Met gruplarında Met grubuna göre CTCF'nin artışı ve bu artışın yine istatistiksel olarak anlamlı olduğu

saptanmıştır ($p<0,0001$). Image J programı ile yapılan intensite ölçümleri Şekil 4.18.'de yer almaktadır.



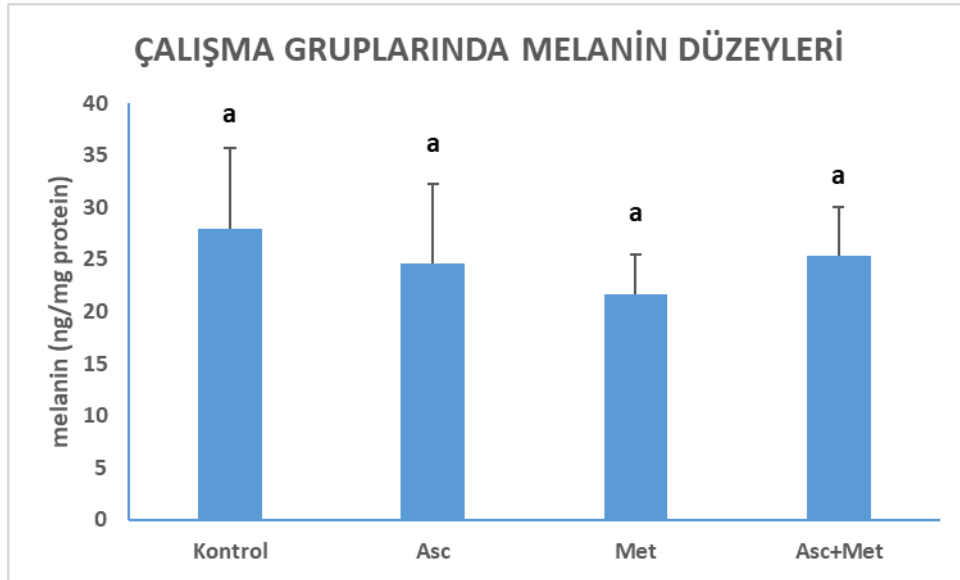
Şekil 4.18. Kantitatif floresan görüntü analizi.

Deney gruplarında anti-tirozinaz ile indirekt immunfloresan işaretlemenin kantitatif floresan görüntü analizi. Anti-tirozinaz immunfloresan işaretleme sonrası deney gruplarına ait 40X büyütmedeki görüntülerden hesaplanan ortalama CTCF (her grup için 5 alanda ve her alanda en az 40 hücrede CTCF). Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

**** $p<0.0001$.

4.7. Melanin Oluşumunun Belirlenmesi

Çalışma gruplarındaki melanin düzeyleri Şekil 4.19.'da ve Tablo 4.5.'te verilmiştir. Buna göre, askorbik asit uygulaması ile melanin düzeyleri kontrole göre %12,01 azalmıştır. Metformin uygulaması ile melanin düzeyleri kontrole göre %22,38 ve kombine uygulama ile melanin düzeyleri %9,24 azalmıştır. Ancak, gruplar arasında melanin düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenememiştir (tümü, $p>0,05$).



Şekil 4.19. Çalışma gruplarında melanin düzeyleri.

^aFarklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

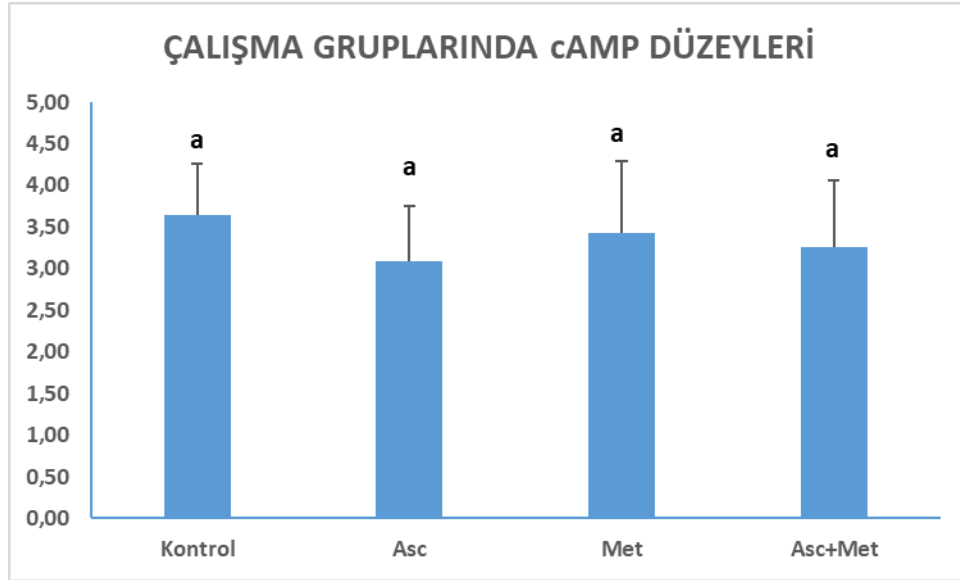
Tablo 4.5. Çalışma gruplarında melanin düzeyleri.

	Melanin düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	27,92±7,77 ^a
Asc	24,57±7,72 ^a
Met	21,67±3,84 ^a
Asc+Met	25,34±4,72 ^a

^aFarklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

4.8. cAMP Oluşumunun Belirlenmesi

Çalışma gruplarıdaki cAMP düzeyleri Şekil 4.20.'de ve Tablo 4.6.'da verilmiştir. Buna göre, askorbik asit uygulaması cAMP düzeylerini kontrole göre %15,10 azaltmıştır. Metformin uygulaması ile cAMP düzeyleri kontrole göre %5,82 ve kombine uygulama ile cAMP düzeyleri kontrole göre %10,68 azalmıştır. Ancak, gruplar arasında cAMP düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmemiştir (tümü, $p > 0,05$).



Şekil 4.20. Çalışma gruplarında cAMP düzeyleri.

^aFarklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

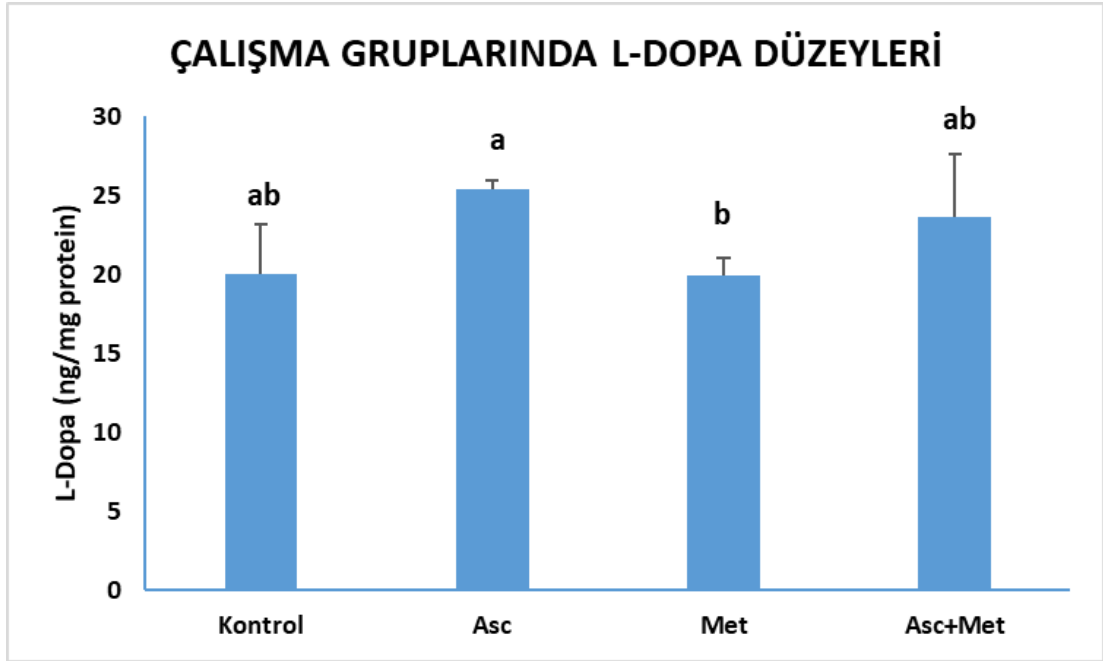
Tablo 4.6. Çalışma gruplarında cAMP düzeyleri.

	cAMP düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	3,64±0,61 ^a
Asc	3,09±0,66 ^a
Met	3,43±0,86 ^a
Asc+Met	3,25±0,80 ^a

^aFarklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

4.9. L-DOPA Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışma gruplarındaki L-DOPA düzeyleri Şekil 4.21.'de ve Tablo 4.7.'de verilmiştir. Buna göre, askorbik asit uygulaması ile L-DOPA düzeyleri kontrole göre %26,82 artmıştır. Metformin uygulaması ile L-DOPA düzeyleri kontrole göre %0,56 azalmıştır ve kombine uygulama ile L-DOPA düzeyleri kontrole göre %18,03 artmıştır. Askorbik asit uygulaması ile metformin uygulaması arasında L-DOPA düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmiştir (p<0,05).



Şekil 4.21. Çalışma gruplarında L-DOPA düzeyleri.

^{a,b}Farklı üssel harfi taşıyan gruplar birbirinden anlamlı derecede farklıdır (p<0,05).

Tablo 4.7. Çalışma gruplarında L-DOPA düzeyleri.

	L-DOPA düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	19,99±3,22 ^{ab}
Asc	25,35±0,58 ^a
Met	19,88±1,17 ^b
Asc+Met	23,59±3,97 ^{ab}

5. TARTIŞMA

Melazma, UV radyasyona maruz kalan bölgelerde aşırı melanin üretimi ile karakterize kronik edinilmiş bir cilt hastalığıdır. Melazma genellikle simetrik yerleşimli, açık kahverengiden koyu kahverengiye değişen, esas olarak yüzde ve çok daha az sıklıkla boyun ve ön kollarda gelişen, düzensiz maküller ve yamalar olarak görülür (51). Melazmanın patogenezi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte daha koyu ten rengine sahip kadınlarda (Fitzpatrick cilt fototipleri III-V'e göre) çok daha sık görüldüğü bilinmektedir. Oral kontraseptifler, gebelik, genetik faktörler, derinin kronik inflamasyonu ve uzun süre güneş ışınlarına maruz kalma gibi faktörler, melazmanın etyopatogenezi ve gelişimini önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir (60,145). Çok daha az sıklıkla görülse de melazmanın, ışığa duyarlılaştırıcı maddelerin kullanımı, tiroit hastalıkları, hepatopatiler, yumurtalık tümörleri vb. faktörlerden kaynaklanabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (64).

Bazı hastalıklar, muhtemelen paylaşılan patomekanizmaları nedeniyle melazma ile daha sık görülmektedir; ancak literatürde melazma komorbiditeleri ile ilgili sadece birkaç rapor bulunmaktadır. Melazmalı kadınlarda polikistik over sendromu ve insülin direncine bağlı adet düzensizliklerinin daha sık teşhis edildiği bildirilmiştir. Bu raporlarda hormonal dengesizliğin de tetiklediği tiroit fonksiyon bozukluğu ve depresyon için benzer bulgular bildirilmiştir (98).

Melazma, duygusal ve psikolojik iyilik hali üzerinde önemli bir etkiye sahip bir hastalıktır ve hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Hastalık genellikle kozmetik bir kusur olarak görülerek ihmal edilmekte ve bu durum yetersiz teşhis ve/veya yanlış tedaviye yol açmaktadır (146).

Melazmanın tedavisi, genellikle tedaviye dirençli olduğu veya uygun tedaviye rağmen tekrarladığı için uzun vadeli ve karmaşıktır. Bu nedenle, bu hastalığı etkili bir şekilde tedavi etmek ve önlemek için patogenetik yolları anlamak çok önemlidir. Başlangıçta, patolojilerin sadece melanositlerle ilgili olduğu

düşünülmesine rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar, keratinositlerin etkileşimi, anormal melanosit aktivasyonu, epidermis ve dermiste melanin ve melanozomların kümelenmesi, artan sayıda mast hücresi, artan vaskülarizasyon, bazal membran hasarı, cilt hücre dışı matriks anormallikleri ve fotoyaşlanmanın da patogeneizde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (60).

Melazma, biyolojik olarak hiperaktif melanositlerin varlığı ile karakterize edilir. Bir melanosit, epidermal bir melanin birimi oluşturmak için 36 keratinosit ile bağlantı halindedir. UV ışınları başta olmak üzere pigment üretimini tetikleyen diğer faktörler, keratinositleri bFGF, interlökin 1 (IL-1), SCF, EDN1, α -MSH, ACTH ve PGE2 dahil olmak üzere büyüme faktörleri üretmeye teşvik ederek hiperpigmentasyon oluşumu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu büyüme faktörleri doğrudan ve dolaylı olarak melanogenezi uyararak melanosit proliferasyonunu arttırabilir. UV radyasyonun yanı sıra parakrin, otokrin ve hormonal faktörler, cAMP, PKA, CREB, MITF, NO, siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve PKC dahil olmak üzere çok sayıda sinyal yolu aracılığıyla melanogenezi düzenler (98).

Melanositlerin gelişimini, proliferasyonunu ve melanin üretimini düzenlediği için melanogeneizde baskın rol oynayan MITF ekspresyonunun ve aktivitesinin söz konusu sinyal yolları aracılığıyla transkripsiyonel olarak düzenlendiği bilinmektedir. MITF TYR, TRP-1 ve TRP-2 gibi melanin üretiminde rol oynayan enzimlerin transkripsiyonunda ve melanozom olgunlaşması, trafiği ve keratinositlere dağılımında rol oynayan birçok genin düzenlenmesinde de görev alır. MITF ekspresyonunun cAMP, CREB, PAX3, Wnt/ β -katenin, LEF-1 gibi transkripsiyonel faktörler tarafından düzenlendiği bilinmektedir. (61).

Melazma tedavisi, karmaşık ve çok faktörlü etiyolojisi, tedaviye direnci ve yüksek nüks oranı nedeniyle son derece zordur. Hastalığın önlenmesinde ve tedavi sürecinde güneş ışınlarına karşı koruma önem taşımaktadır. Tedavinin ana prensipleri; melanin sentez yollarının inhibisyonu, melanositlerden keratinositlere melanozom transferinin engellenmesi ve üretilen melaninin ciltten

uzaklaştırılmasıdır. İdeal bir terapötik yaklaşım, en iyi sonuçları elde edebilmek için birden fazla patogenetik mekanizmayı içermelidir (98).

Geleneksel melazma tedavisi bir tirozinaz inhibitörü olan HQ, tretinoin, glukokortikosteroidler ve çeşitli formülasyonlar dahil olmak üzere topikal ajanları içermektedir. Hiperpigmentasyon hastalıklarının tedavisinde topikal ilaçlar hala ilk tercihtir ve birçok ülkede melazma tedavisinde HQ altın standarttır. HQ, en popüler ve en etkili anti-melanogenik ajanlardan biri olan fenol grubundan organik bir kimyasal bileşiktir ve tirozinazın kompetitif inhibisyonu ile 1-3,4-dihidroksifenilalaninin melanine dönüşümünü inhibe eder (86,147). Çalışmalar, %4 HQ, %0.05 tretinoin ve %0.01 fluosinolon asetonidden oluşan üçlü kombinasyon kreminin tek başına veya ikili kombinasyon halinde %4 HQ'dan biraz daha etkili olduğunu göstermiştir; bu nedenle, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış HQ içeren tek ilaçtır. HQ ile ilgili güvenlik sorunları ne yazık ki hala tartışmalı ve belirsizdir, bu nedenle Avrupa Komisyonu, ekzojen okronoz, kalıcı depigmentasyon ve hatta HQ'un p-benzokinon metabolitlerine bağlı potansiyel kanser riski gibi olası komplikasyonları nedeniyle kullanımını yasaklamıştır (116,147). Bu durum benzer etkinliğe ve daha düşük yan etki riskine sahip tedavi seçenekleri için araştırmaların hız kazanmasını sağlamıştır.

Melazmanın farmakolojik tedavisindeki son gelişmeler, melazmanın patogenetik yollarındaki farklı basamakları hedefleyen tedavi seçeneklerini içermektedir. Bu yeni seçeneklerden biri melazma tedavisinde topikal metformin uygulamasıdır. cAMP ile indüklenen melanogenezde, PKA ve CREB fosforilasyonunun aktivasyonunun aracılık ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda antidiyabetik bir ilaç olan metforminin protein fosforilasyonunun inhibisyonunu indüklediği ve cAMP seviyesini düşürerek melanositlerdeki melanin üretimini azalttığı belirlenmiştir (131). Metforminin PKA ve CREB ekspresyonları üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (98).

Yeni tedavi seçenekleri arasında gösterilen ve iyi bilinen bir antioksidan olan askorbik asit, tirozinaz enziminin yapısında yer alan bakıra bağlanarak tirozinazı inhibe eder ve melanin ara ürünlerinin oksidatif polimerizasyonunu baskılayarak

melanin üretimini inhibe eder. Askorbik asidin derideki biyoyararlanımı oral yoldan verildiğinde yetersizdir (9). Bu nedenle askorbik asit daha çok topikal formülasyonlar şeklinde hazırlanarak kullanılmaktadır. Ancak, askorbik asit kolay bozulan bir maddedir ve zayıf penetrasyon göstermektedir. Ayrıca yüksek konsantrasyonda askorbik asit kullanımı sonucunda özellikle hassas ciltlerde irritasyon görülebilmektedir (148). Bu doğrultuda, askorbil tetra izopalmitat, magnezyum askorbil fosfat, askorbil palmitat, sodyum askorbil fostat gibi ester formunda ve daha stabil askorbik asit türevlerinin sentezleri, farklı salım sistemleri ve etkinlikleri üzerine çalışmalar devam etmektedir (9).

Literatürde metforminin ve askorbik asidin melanogenez üzerindeki etkinliğine dair az sayıda çalışma bulunmakla birlikte bilginiz dahilinde MNT-1 hücrelerinde yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Aşağıda metformin ve askorbik asidin melazma tedavisinde kullanılmasına yönelik literatürde yer alan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ve bu tez çalışması kapsamında MNT-1 hücreleri ile yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular sitotoksosite, hücre için ROS düzeyleri, tirozinaz aktivitesi, tirozinaz gen ekspresyonu, melanin oluşumu, cAMP oluşumu, L-DOPA düzeyleri, sitopatoloji ve tirozinazın immünofloresan olarak işaretlenmesi isimli başlıklarda detaylı olarak tartışılacaktır.

5.1. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Metforminin ve askorbik asidin melanoma hücre canlılığı üzerine etkileri ile ilgili literatürde az sayıda çalışma yer almakla birlikte metformin ve askorbik asitin melanoma hücrelerinde kombine kullanımına dair literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda MNT-1 hücrelerinden farklı melanoma hücrelerinin kullanıldığı, hücre canlılığının değerlendirildiği deneyler sonucunda farklı doz değerlerinin belirlendiği ve çalışmaların farklı sürelerde gerçekleştirildiği görülmektedir.

5.1.1. Askorbik Asidin Sitotoksitesisi

Panich ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada UV ışınları ile uyarılan G361 melanoma hücre hattında askorbik asidin antimelanojenik etkisi araştırılmıştır. Literatürde yer alan zayıf pigmentli hücrelerin UVA kaynaklı oksidatif strese karşı daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmalar doğrultusunda askorbik asitin melanogenez üzerindeki etkisinin araştırılması için zayıf pigmentli G361 melanoma hücre hattının seçildiği belirtilmiştir (149).

Askorbik asidin G361 hücrelerinde azalan tirozinaz aktivitesinin ve melanin içeriğinin sitotoksik etkiden kaynaklanmadığını doğrulamak için MTT yöntemi kullanılarak hücre canlılığı belirlenmiştir. Mitokondri ve sitozoldeki enerji oluşumu sürecinde MTT'nin mor formazan ürününe indirgenmesi, metabolik olarak aktif hücreleri göstermektedir. Kontrol grubuna herhangi bir askorbik asit uygulaması yapılmazken, deney grubundaki hücrelere 15 µM, 30 µM, 60 µM, 120 µM ve 240 µM dozlarda askorbik asit uygulanmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler 15 µM, 30 µM, 60 µM, 120 µM ve 240 µM konsantrasyonlarda uygulanan askorbik asidin sitotoksitesiteye neden olmadığını göstermiştir (149).

Lee ve ark. (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada askorbik asidin melanogenez üzerindeki etkisi B16F10 melanoma hücre hattı kullanılarak araştırılmıştır. B16F10 melanoma hücreleri 0, 50, 100, 200 ve 500 µM dozlarda askorbik aside maruz bırakılarak 37°C'de 5 gün süreyle inkübe edilmiştir ve suda çözünür tetrazolyum tuzu (WST) yöntemiyle sitotoksitesite belirlenmiştir. Kullanılan konsantrasyonlarda askorbik asit hücrelerde herhangi bir toksitesiteye neden olmazken, 50 ve 100 µM konsantrasyonda askorbik asitin hücrelerin canlılığını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (150).

Choi ve ark. (2010) tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise, hiperpigmentasyon üzerine etkisi farklı çalışmalarla daha önce de değerlendirilen askorbik asidin melanogenez üzerindeki etkisi, multivitamin karışımının (10.000 IU A vitamini, 1.000 IU D vitamini, 5 IU E vitamini, 50 mg B1 vitamini, 12,7 mg B2 vitamini, 15 mg B6 vitamini, 500 mg askorbik asit, 100 mg nikotinamid ve 25 mg B5

vitamini) melanogenez üzerindeki etkisi ile karşılaştırılmıştır. B16F10 murin melanoma hücre hattı kullanılan çalışmada 1 μ M α -MSH ile uyarılan hücrelerin hücre canlılığı kristal viyole kullanılarak belirlenmiştir. 0, 6,25, 12,5 ve 25 μ g/ml konsantrasyonlarda multivitamin karışımı ve 0, 6,25, 12,5 ve 25 μ g/ml konsantrasyonlarda askorbik asit ile 24 saat inkübe edilen hücrelere %10 etanol içinde %0.1 kristal viyole uygulanarak hücreler oda sıcaklığında 5 dakika boyanmış ve ardından dört kez yıkanmıştır. Tutunan hücrelerdeki kristal viyole daha sonra %95 etanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve hücre canlılığı belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda 0-25 μ g/ml konsantrasyonda multivitamin ve askorbik asit uygulamasının melanoma hücrelerinin çoğunda (>%90) sitotoksik etki göstermediği; ilgili çalışmada veriler sunulmamakla birlikte, 150 μ g/ml askorbik asit uygulanan hücrelerde hücre canlılığının %12 olduğu ve önemli derecede sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (151).

Panich ve ark. (2011) askorbik asidin sitotoksitesini belirlemek için G361 melanoma hücre hattı ile çalışmıştır. MTT yöntemiyle ölçülen sitotoksikite çalışmalarında 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M ve 240 μ M konsantrasyonlarda uygulanan askorbik asidin sitotoksik olmadığı belirlenmiştir. Lee ve ark. (2011) tarafından B16F10 hücrelerine 50, 100, 200 ve 500 μ M dozlarda askorbik asit uygulanmış ve hücre canlılığı WST yöntemiyle belirlenmiştir. Kullanılan konsantrasyonlarda askorbik asidin hücrelerde herhangi bir toksisiteye neden olmadığı, ancak 50 ve 100 μ M konsantrasyonda askorbik asidin hücrelerin canlılığını önemli ölçüde artırdığı ifade edilmiştir. Choi ve ark. (2010) B16F10 hücrelerine 0, 6.25, 12.5 ve 25 μ g/ml konsantrasyonlarda vitamin C uygulamış ve kristal viyole absorbansını ölçerek hücre canlılığını belirlemişlerdir. 0, 6,25, 12,5 ve 25 μ g/ml konsantrasyonlarda askorbik asidin sitotoksik etki göstermediği; ilgili çalışmada veriler sunulmamakla birlikte, 150 μ g/ml C vitamini uygulanan hücrelerde hücre canlılığının %12 olduğu ve önemli derecede sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında Panich ve ark. (2011), Lee ve ark. (2011) ve Choi ve ark. (2010)'nın çalışmalarında kullandıkları melanoma hücre hatlarından farklı bir melanoma hücre hattı olan MNT-1 hücre hattı ile çalışılmıştır. MNT-1 hücrelerinde askorbik asidin sitotoksitesini Panich ve ark. (2011) 'na benzer şekilde MTT yöntemi

ile belirlenmiştir. 6 farklı günde gerçekleştirilen deneyde hücrelere 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM ve 25 μM dozlarda askorbik asit çözeltisi uygulanmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra kontrole kıyasla MNT-1 melanoma hücrelerinin canlılığı belirlenmiştir. MTT deney sonucunda seçilen askorbik asit konsantrasyonu 0,5 μM 'dır ve askorbik asitin doz bağımlı bir sitotoksosite oluşturduğu söylenebilir.

5.1.2. Metforminin Sitotoksitesi

Tomic ve ark. (2011) tarafından metforminin melanoma hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan çalışmada 1-10 mM aralığında konsantrasyonda metformin A375, WM9, SKMel28 ve G361 melanoma hücre hatlarına ve insan melanositlerine uygulanmış ve hücre canlılığı hücrelerin tripan mavisi ile boyanması ile değerlendirilmiştir. Hücreler 72 saat boyunca 0, 1, 2.5, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda metformine maruz bırakılmış ve deney sonunda melanoma hücre sayısında doza bağlı azalma gözlemlendiği; buna karşılık, insan melanositlerinin metformin tedavisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Ek olarak metforminin, hasta tümörlerinden yeni izole edilmiş iki melanoma hücre hattının hücre sayısında doza bağlı azalmayı indüklediği belirlenmiştir. 0., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde gerçekleştirilen deneylerde, PBS uygulanan kontrol grubuna kıyasla 10 mM metformin uygulamasının hücre sayısında önemli bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (129).

Bu tez çalışması kapsamında Tomic ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışmada yer alan A375, WM9, SKMel28 ve G361 melanoma hücre hatlarından farklı bir melanoma hücre hattı ile çalışılmıştır. MNT-1 hücrelerinde metformin sitotoksitesi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. 6 farklı günde gerçekleştirilen deneyde hücrelere 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM , 2500 μM ve 5000 μM dozlarda metformin hidroklorür çözeltisi uygulanmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra kontrole kıyasla MNT-1 melanoma hücrelerinin canlılığı belirlenmiştir. Deney sonucunda seçilen metformin hidroklorür konsantrasyonu 50 μM 'dır ve metforminin doz bağımlı bir sitotoksosite oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

5.2. Hücre İçi ROS Oluşumunun Değerlendirilmesi

5.2.1. Askorbik Asidin ROS Oluşumu Üzerine Etkileri

Panich ve ark. (2011) tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada UV ışınları ile uyarılan G361 melanoma hücre hattında askorbik asidin antimelanojenik etkisinin yanı sıra hücre içi oksidasyon oluşumu da araştırılmıştır (149).

Askorbik asidin UVA (8 J/cm^2) ile indüklenmiş G361 melanoma hücrelerinde oksidan üretimi üzerindeki etkileri spektrofotometri ile belirlenmiştir. Yöntemde stabil ve floresan olmayan bir boya olan 2',7'-diklorofloresein diasetat (DCFH-DA) kullanılmıştır. DCFH-DA, hücrelerde DCFH'ye hidrolize edildikten sonra reaktif oksijen türleri tarafından floresan 2,7 diklorofloreseine (DCF) oksitlenir. Hücre içi oksidan oluşumunu gösteren DCF'nin nispi floresans yoğunluğu, UVA ışınmasıyla indüklenen hücresel oksidatif stresi belirlemektedir. Takiben, hücrelere askorbik asit uygulandıktan sonra, hücreler UVA'ya maruz bırakılmış ve 1 saat boyunca DCFH-DA ($5 \mu\text{M}$) ile inkübe edilmiştir. DCF floresansı 20 dakika süreyle izlenmiştir. Elde edilen veriler, UVA'ya maruz bırakılmayan ve askorbik asit uygulanmayan kontrol hücrelerinin (%100) hücre içi oksidan oluşumunun (nispi floresan U/RFU) yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Çalışmanın sonunda askorbik asitin, G361 melanoma hücrelerinde UVA ile indüklenen ROS oluşumunu inhibe edebilen antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Hücrelerin 8 J/cm^2 'lik UVA ışınına maruz bırakılması $73,97 \pm 7,1$ RFU'luk ROS üretimine neden olurken, UVA'ya maruz bırakılmayan hücrelerde ROS oluşumunun $3,7 \pm 0,7$ RFU olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte hücrelere, 60 ve $120 \mu\text{M}$ askorbik asit uygulamasının UVA'ya bağlı ROS oluşumunu doza bağımlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (149).

Choi ve ark. (2010)'nın yaptığı ve önceden sözü edilen çalışmada askorbik asidin antioksidan etkisi, multivitamin karışımının antioksidan etkisi ile karşılaştırılmıştır. Multivitamin ve askorbik asidin antioksidan etkileri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidan analizi ile değerlendirilmiştir. Absorbanslar karşılaştırıldığında hem askorbik asit hem de multivitamin karışımının doza bağımlı olarak serbest radikal süpürme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Askorbik asidin

antioksidan etkisinin, 12,5 µg/ml'lik konsantrasyonda multivitamin karışımından önemli ölçüde daha fazla olduğu; 6,5 µg/ml ve 25 µg/ml'de iki grup arasında antioksidan etkide önemli bir fark gözlenmediği ifade edilmiştir (151).

Yaptığımız çalışmada, askorbik asit uygulanan MNT-1 hücrelerinde, hücre sayılarının normalizasyonu sonrasında hücre içi ROS düzeylerinin %8,97 arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. MNT-hücrelerinde yapılan benzer bir çalışma olmadığı için literatürle karşılaştırma yapılamamıştır.

5.2.2. Metforminin ROS Oluşumu Üzerine Etkileri

Oscilowska ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada C32 melanoma hücre hattında metformin kaynaklı apoptoz mekanizmasında prolin dehidrogenaz (PRODH)/prolin oksijenazın (POX) rolü araştırılmıştır. PRODH/POX, kanser hücrelerinin hayatta kalmasının ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan prolini parçalayan bir mitokondriyal enzimdir. Çalışma kapsamında hücre içi reaktif oksijen türlerinin birikimi, bir floresan prob olarak DCFH-DA kullanılarak ölçülmüştür. Hücreler 20 µM DCFH-DA ile kültür ortamında 30 dakika önceden inkübe edildikten sonra iki kez PBS ile yıkanmıştır ve 24 saat boyunca artan konsantrasyonlarda metformin (0-20 mM), 200 µM tetrahidrofuroik asit (THFA) ve metformin+THFA kombinasyonu uygulanmıştır. THFA prolin analogudur ve çalışmada PRODH/ POX inhibitörü olarak kullanılmıştır. Florimetri ile elde edilen sonuçlar metforminin C32 melanoma hücrelerinde ROS oluşumunun artmasına neden olduğunu göstermektedir. Spesifik bir PRODH/POX inhibitörü olan THFA'nın ise, metforminin neden olduğu ROS oluşumunu azalttığı belirlenmiştir (152).

Yaptığımız çalışmada, metformin uygulanan MNT-1 hücrelerinde, hücre sayılarının normalizasyonu sonrasında hücre içi ROS düzeylerinin %39,12 arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. MNT-hücrelerinde yapılan benzer bir çalışma olmadığı için literatürle karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak, Oscilowska ve ark. (2022) tarafından yapılan çalışmaya benzer olarak hücre

içi ROS düzeylerinde metformin uygulamasıyla artış görülmesi, metforminin melanoma hücre hatlarında ROS oluşumunu tetiklediğini göstermektedir. Diğer taraftan, kombine uygulama ile hücre içi ROS düzeylerinde görülen %27,35'lik artışın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bu durumda, kombine uygulama ile görülen artışın genel olarak metformin uygulamasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

5.3. Tirozinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

5.3.1. Askorbik Asidin Tirozinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Panich ve ark. (2011)'nın yaptığı çalışmada UV ışınları ile uyarılan G361 melanoma hücre hattında hücrel tirozinaz aktivitesini belirlemek için L-DOPA oksidasyon hızı kullanılmıştır. Hücelere 7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM ve 120 µM dozlarda askorbik asit uygulanmıştır. Deneyde 37°C'de enzimatik reaksiyonu başlatmak için substrat olarak 10 µL 20 mM konsantrasyonda L-DOPA eklenmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan dopakrom absorbansı, 1 saat boyunca her 10 dakikada bir ölçülmüştür. UVA'ya maruz bırakılmayan ve askorbik asit uygulanmayan kontrol hücrelerinde protein içeriğinin 0,28±0,01 U/µg olduğu ve UVA uygulamasının, tirozinaz aktivitesinde %58,87±%7,3 (p<0,01) artışa neden olduğu gösterilmiştir. 7.5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM ve 120 µM dozlarda askorbik asit uygulamasının UVA tarafından indüklenen hücrel tirozinaz aktivitesini azaltmadığı belirlenmiştir (149).

Panich ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışmada G361 melanoma hücreleri tirozinaz aktivitesinin indüklenmesi için UVA ışınına maruz bırakılmıştır. UVA ile uyarılan hücelere 7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM ve 120 µM dozlarda askorbik asit uygulanmıştır. L-DOPA oksidasyon hızının değerlendirildiği çalışmada belirtilen dozlarda askorbik asit uygulamasının UVA tarafından indüklenen hücrel tirozinaz aktivitesini azaltmadığının belirlendiği ifade edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında MNT-1 hücelere 0,5 µM konsantrasyonda askorbik asit uygulanmıştır. Tirozinaz aktivitesi UVA ya da başka bir dış etken tarafından

indüklenmemiştir. Tirozinaz düzeyleri sandviç-ELISA esasına dayanan insan tirozinaz kitiyle ölçülmüştür. Analiz sonucunda askorbik asit uygulamasının tirozinaz düzeylerini kontrole göre %13,93 arttırdığı belirlenmiştir.

5.3.2. Metforminin Tirozinaz Düzeyleri Üzerine Etkisi

Lehraiki ve ark. (2014) tarafından metforminin melanogeneze rol oynayan üç anahtar melanogenik protein (tirozinaz, TRP-1 ve TRP-2) düzeyleri üzerindeki etkileri Western blot analizleri kullanılarak incelenmiştir. B16F10 hücrelerinde metforminin toplam melanin seviyeleri üzerindeki etkileriyle uyumlu olarak, tirozinaz, TRP-1 ve TRP-2'nin bazal seviyelerini azalttığı ve forskolin ve α -MSH'nin tirozinaz, TRP-1 ve TRP-2 seviyelerinde neden olduğu artışları bloke ettiği belirlenmiştir (131,153).

Bu tez çalışması kapsamında MNT-1 hücrelerine 50 μ M konsantrasyonda metformin hidroklorür uygulanmıştır. Tirozinaz düzeyleri sandviç-ELISA esasına dayanan insan tirozinaz kitiyle ölçülmüştür. Metformin uygulaması ile tirozinaz düzeylerinin kontrole göre %10,14 oranında ve metformin +askorbik asit uygulaması ile tirozinaz düzeylerinin kontrole göre %32 arttığı belirlenmiştir. Metformin ve askorbik asitin birlikte uygulandığı kombine grup ile kontrol grubu arasında tirozinaz düzeyleri açısından anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Lehraiki ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada belirlenenin aksine metforminin tirozinaz düzeylerini azaltmadığı; aksine arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Sonuçlardaki farklılıkların kullanılan hücre hatlarının farklı olması, farklı konsantrasyonlarda metformin uygulanması, inkübasyon sürelerinin farklı olması gibi nedenlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

5.4. Tirozinaz Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

5.4.1. Askorbik Asidin Tirozinaz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Lee ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada askorbik asidin tirozinaz gen ekspresyonu üzerine etkisi B16F10 melanoma hücre hattı kullanılarak araştırılmıştır. 50, 100, 200 ve 500 μM dozlarda askorbik asit uygulamasının B16F10 hücrelerinin hücrel tirozinaz aktivitesi üzerinde önemli bir uyarıma neden olduğu; bu bulgunun, tirozinaz zimografisinden elde edilen sonuçlarla benzer olduğu ifade edilmiştir. Tirozinaz gen ekspresyonunun belirlenmesi için yapılan Western blot ve RT-PCR analizlerinden elde edilen veriler askorbik asitin B16F10 hücrelerinde tirozinazın hücrel enzimatik aktivitesini yukarı doğru düzenlediğini ve enzimin mRNA ve protein düzeylerini arttırdığını düşündürmüştür. Bununla birlikte, literatürde askorbik asidin bir prooksidan olarak hareket ederek apoptozu indüklediğini gösteren zıt bulgular olduğundan çalışma sonucunda elde edilen bu farklılığın hücrelere uygulanan askorbik asit konsantrasyonları ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (150).

Choi ve ark. (2010)'nın yaptığı çalışmada B16F10 melanoma hücrelerinde C vitamininin tirozinaz gen ekspresyonu üzerine etkisi, yukarıda belirtilen multivitamin karışımının tirozinaz gen ekspresyonu üzerine etkisi ile karşılaştırılmıştır. Multivitamin karışımının ve C vitamininin tirozinaz ekspresyonu üzerindeki etkilerini belirlemek için Western blot analizi yapılmıştır. $\alpha\text{-MSH}$ ile veya $\alpha\text{-MSH}$ olmadan uyarılan hücrelere 48 saat boyunca 25 $\mu\text{g/ml}$ askorbik asit veya multivitamin karışımı uygulanmıştır. Multivitamin uygulamasının, $\alpha\text{-MSH}$ tarafından uyarılan tirozinaz ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği; bunun aksine askorbik asidin tirozinaz ekspresyonunu azaltmadığı belirlenmiştir (151).

Bu tez çalışması kapsamında MNT-1 hücrelerine 0,5 μM konsantrasyonda askorbik asit uygulanmıştır. Tirozinaz gen ekspresyonu RT-qPCR analizi ile belirlenmiştir. Lee ve ark. (2011) ve Choi ve ark. (2010)'nın yaptığı çalışmaların aksine 0,5 μM konsantrasyonda askorbik asitin MNT-1 hücrelerinde tirozinaz gen ekspresyonunu %11 azalttığı belirlenmiştir. Bulguların farklı olmasında askorbik asit

konsantrasyonlarının farklı olmasının, uygulama süresinin ve farklı hücre hatlarıyla çalışılmasının etkili olabileceği düşünülmektedir.

5.4.2. Metforminin Tirozinaz Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Lehraiki ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada metforminin, B16-F10 murine melanoma hücrelerinde ve normal insan melanositlerinde melanin sentezi üzerindeki etki mekanizmasını belirlemek için MITF, tirozinaz, TRP1 ve DCT gibi melanogenezde yer alan anahtar proteinler üzerindeki etkisi incelenmiştir (131).

Kontrol grubu, 5 mM metformin uygulanan grup, 10 mM metformin uygulanan grup, 20 µM forskolin uygulanan grup, 10 mM metformin+ 20 µM forskolin uygulanan grup, 10 µM α-MSH uygulanan grup ve 10 mM metformin+ 10 µM α-MSH uygulanan grup olmak üzere çalışma grupları oluşturulmuştur. B16 hücrelerinde ve normal insan melanositlerinde forskolin veya MSH uygulamasının MITF, tirozinaz ve TRP1 protein seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı; metformin uygulamasının ise MITF, tirozinaz, TRP1 ve DCT düzeylerini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (131,153).

Normal insan melanositlerine forskolin uygulandığında TRP1 ve DCT seviyelerinde önemli bir artış gözlemlendiği; metformin uygulamasının ise MITF, tirozinaz ve DCT seviyelerini doza bağlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Normal insan melanositlerinin hem metformin hem de forskolin ile birlikte uyarılması sonucunda MITF, tirozinaz ve DCT'nin yok olduğu belirtilmiştir. Hem B16 hücrelerinde hem de normal insan melanositlerinde 12 saatlik metformin uygulamasından sonra MITF ve melanogenezde rol oynayan genlerde bir azalma gözlemlendiği ifade edilmiştir (131,153).

Bu tez çalışmasında MNT-1 hücrelerine 50 µM konsantrasyonda metformin hidroklorür uygulanmıştır. Tirozinaz gen ekspresyonu RT-qPCR analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda metforminin tirozinaz gen ekspresyonunu %3 oranında arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuç metformin uygulaması ile tirozinaz

düzeylerinin kontrole göre arttığı sonucunu da desteklemektedir. Kombine uygulama ile tirozinaz gen ekspresyonunun %30 arttığı tespit edilmiştir.

5.5. Sitopatoloji

5.5.1. Askorbik Asit Uygulaması Sonrasında Sitopatoloji

Choi ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada 1 μ M α -MSH ile uyarılan B16F0 murin melanoma hücrelerine 0; 6,25, 12,5 ve 25 μ g/ml konsantrasyonlarda C vitamini ve aynı konsantrasyonlarda yukarıda içeriği verilen multivitamin karışımı uygulanmıştır. B16F0 murin melanoma hücrelerindeki morfolojik değişiklikleri değerlendirmek için, melanositler bir faz kontrast mikroskopu altında gözlemlenmiş ve mikroskop için bir dijital kamera kullanılarak fotoğraflanmıştır. Multivitamin ve askorbik asit uygulamasından sonra, hücreler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında morfolojide önemli bir değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir (151).

Bu tez çalışması kapsamında MNT-1 hücrelerinin sitopatolojisi faz kontrast mikroskop ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda sitoplazmasında kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücrelerinin çoğunlukta olduğu görülmüştür. Askorbik asit uygulanan grupta kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücrelerinin kontrole kıyasla daha az olduğu görülmüştür. Bu durum, askorbik asitin neden olduğu melanin düşüşünden (%12,01) kaynaklanabilir.

5.5.2. Metformin Uygulaması Sonrasında Sitopatoloji

Lehraiki ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada metforminin yeniden yapılandırılmış insan epidermisi üzerindeki etkisi test edilmiştir. Hücrelerin forskolin ve/veya metformin ile 15 günlük stimülasyonundan sonra yeniden yapılandırılmış insan epidermisini içeren kuyuların fotoğrafı, forskolinin melanin ekspresyonunu arttırdığını, metforminin sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (131).

Lehraiki ve ark. (2014) tarafından yapılan aynı çalışmada doğrudan abdooplastiden hazırlanan insan derisi biyopsileri üzerinde başka bir dizi deney gerçekleştirilmiştir. Biyopsiler 15 gün boyunca kültürde tutulmuş ve forskolin ve/veya metformin ile ikişer gün süreyle uyarılmıştır. Hücre içi melanini saptamak için parafinle dondurulmuş deri kesitlerinde Fontana-Masson boyaması yapılmıştır. Forskolin melanin içeren hücrelerin sayısını artırırken, metforminin, kontrol ve forskolin ile uyarılan koşullarda melanin pozitif hücrelerin sayısını güçlü bir şekilde azalttığı belirlenmiştir (131).

Bu tez çalışması kapsamında MNT-1 hücrelerinin sitopatolojisi faz kontrast mikroskop ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda sitoplazmasında kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücrelerinin çoğunlukta olduğu görülmüştür. Metformin uygulanan grupta kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücrelerinin kontrole kıyasla daha az olduğu ve bölünemeyen büyük sitoplazmalı hücrelerin yer aldığı gözlenmiştir. Bu durum, metforminin neden olduğu melanin düşüşünden (%22,38) kaynaklanabilir. Diğer taraftan, askorbik asit ve metforminin beraber uygulandığı kombine grupta ise kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücrelerinin kontrol grubu ile benzer yoğunlukta olduğu belirlenmiştir. Melanin düzeylerindeki değişikliğin kontrole göre en düşük olduğu grup kombine grup olduğu için, pigmentasyonun da kontrole en yakın olduğu grubun kombine uygulama grubu olduğu söylenebilir.

5.6. Tirozinazın İmmünofloresan Olarak İşaretlenmesi

Bilgimiz dahilinde literatürde askorbik asidin ve metforminin melanoma hücreleri üzerine etkisinin tirozinazın immünofloresan olarak işaretlenerek değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında MNT-1 hücrelerine 0,5 μ M konsantrasyonda askorbik asit, 50 μ M konsantrasyonda metformin, 0,5 μ M askorbik asit ve 50 μ M metformin kombinasyonu uygulanmış ve tirozinaz enzimi indirekt immünofloresan boyama yöntemi ile işaretlenerek floresan ataçmanlı araştırma mikroskopu ve kamera/görüntü analiz sistemi kullanılarak her bir gruptaki hücrelerin floresansları görüntülenmiştir.

Askorbik asit uygulanan grupta immunfloresan incelemede çok sayıda mitotik hücre izlenmiştir. Anti-tirozinaz ile yapılan indirekt immunfloresan işaretlemelerde deney gruplarında MNT-1 hücrelerinde sitoplazmada granüller, noktasal işaretlenmeler izlenmiştir.

Immunfloresan görüntülemenin ardından deney gruplarında Image J analiz programı kullanılarak immunfloresan yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Image J ile yapılan yoğunluk ölçümleri sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde Asc ve Asc+Met gruplarının kontrolden farklılığı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,0001$). Ayrıca Asc ve Met ve de Met ve Asc+Met gruplarının arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,0001$).

5.7. Melanin Oluşumunun Değerlendirilmesi

5.7.1. Askorbik Asidin Melanin Oluşumu Üzerine Etkisi

Panich ve ark. (2011) G361 melanoma hücrelerinde melanin sentezini ^{14}C -DOPA'nın alımı üzerinden alternatif bir yöntem ile belirlemiştir. Hücreler yukarıda belirtilen dozlarda askorbik asit uygulanarak ve $16 \text{ J/cm}^2\text{UVA}$ ile uyarılmıştır ve sonrasında toplam melanin miktarı belirlenmiştir. UVA'ya maruz bırakılmayan ve askorbik asit uygulanmayan kontrol hücrelerinde melanin içeriğinin $1,7\pm 0,1 \text{ ng}/\mu\text{g}$ olduğu ve UVA uygulamasının melanin içeriğinde $\%28,22\pm\%7$ ($p<0,001$) artışa neden olduğu gösterilmiştir. UVA uygulaması sonucunda artan melanin miktarının konsantrasyona bağlı bir şekilde $60 \mu\text{M}$ ($p<0,01$) ve $120 \mu\text{M}$ ($p<0,001$) dozlarda askorbik asit uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir (149).

B16F0 murin melanoma hücrelerinde melanin miktarı Choi ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada değerlendirilmiştir. $1 \mu\text{M}$ α -MSH ile uyarılan B16F0 murin melanoma hücrelerine yukarıda belirtilen dozlarda askorbik asit ve multivitamin karışımı uygulanmıştır. Askorbik asit ve multivitamin uygulamasının melanin içeriğini doza bağımlı bir şekilde azalttığı; melanin sentezinin, multivitamin

grubunda askorbik asit grubuna göre önemli ölçüde daha belirgin azaldığı ($p < 0,05$) ifade edilmiştir (151).

B16F10 melanom hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada Lee ve ark. (2011) artan dozlarda askorbik asit uygulamasının melanin içeriği üzerine etkisini incelemiştir. 50-200 μM konsantrasyonda askorbik asit uygulamasının B16F10 melanoma hücrelerinde melanin içeriğini arttırdığı görülmüştür. 50 ve 100 μM 'lik dozlarda askorbik asidin hücre canlılığını stimüle ettiği ve çalışmada araştırılan diğer parametrelere oldukça benzer şekilde 100 μM askorbik asidin B16F10 melanoma hücrelerinde melanin içeriğini ve proliferasyonunu önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (150).

Bu tez çalışması kapsamında MNT-1 hücrelerine 0,5 μM konsantrasyonda askorbik asit uygulanmıştır. Melanin miktarı sandviç ELISA prensibini kullanan bir insan melanin ELISA kiti ile belirlenmiştir. Analiz sonucuna göre, askorbik asit uygulaması ile melanin düzeyleri kontrole göre %12,01 azalmıştır. Ancak, gruplar arasında melanin düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenememiştir ($p > 0,05$, kontrole göre tümü). Lee ve ark. (2011)'nin bulgularından farklı sonuçlar elde eden Panich ve ark. (2011) ve Choi ve ark. (2010)'nin yaptıkları çalışma sonuçlarına benzer şekilde 0,5 μM konsantrasyonda askorbik asit uygulamasının MNT-1 hücrelerinde melanin oluşumunu azalttığı söylenebilir.

5.7.2. Metforminin Melanin Oluşumu Üzerine Etkisi

Lehraiki ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada metforminin melanogenez üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. B16-F10 melanoma hücreleri kullanılan çalışmada hücreler 72 saat süreyle melanogenezini indüklediği bilinen α -MSH ve forskoline maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu, 5 mM metformin uygulanan grup, 10 mM metformin uygulanan grup, 20 μM forskolin uygulanan grup, 10 mM metformin+ 20 μM forskolin uygulanan grup, 10 μM α -MSH uygulanan grup ve 10 mM metformin+ 10 μM α -MSH uygulanan grup olmak üzere farklı çalışma grupları oluşturularak α -MSH ve forskoline maruziyete bağlı olarak B16-F10 murine melanoma hücre hattında melanin miktarında meydana gelen artış spektrofotometrik

olarak ölçülmüştür. Forskolin ve α -MSH'ın 72 saatlik inkübasyonun sonunda melanoma hücrelerinde melanin içeriğinde yüksek bir artışa neden olduğu; ancak, metforminin bazal, forskolin ve α -MSH ile uyarılan koşullarda melanin sentezini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (131,153).

Lehraiki ve ark. (2014) tarafından 2014 yılında yapılan *in vitro* olarak elde edilen sonuçların metforminin melanogenez üzerinde gözlemlenen *in vivo* etkisi ile uyumlu olup olmadığını test etmek için, metforminin C57BL/6J farelerinin kuyruk pigmentasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, C57BL/6J farelere, 8 hafta boyunca metformin (10 mM), forskolin (20 μ M) ve metformin (10 mM)+forskolin (20 μ M) kombinasyonu topikal olarak uygulanmıştır. Fare kuyruklarının ucunda genellikle yüksek pigmentasyon değişkenliği olduğundan, bu alandaki homojen pigmentasyon dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. Farelere uygulanan forskolinin günlük topikal uygulamasının cilt renginin koyulaşması üzerinde hiçbir etkisi olmadığı; bu sonucun aksine, farelerde metformin kaynaklı melanin içeriğindeki azalma nedeniyle kuyruk depigmentasyonunun gözlemlendiği belirtilmiştir. Farelere forskolin ile metforminin birlikte uygulanmasıyla metforminin melanin içeriğini azaltıcı etkisinin daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir (131).

Bu tez çalışması kapsamında MNT-1 hücreleri forskolin veya α -MSH gibi melanogenezi uyaran ajanlara maruz bırakılmamıştır. Hücrelere 50 μ M konsantrasyonda metformin hidroklorür uygulanmıştır. Analiz sonucunda metformin uygulaması ile melanin düzeylerinin kontrole göre %22,38 ve kombine uygulama melanin düzeylerinin kontrole göre %9,24 azaldığı belirlenmiştir. Ancak, gruplar arasında melanin düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$, kontrole göre tümü). Metforminin melanin miktarını azaltması Lehraiki ve ark. (2014) tarafından bulunan sonuçları desteklemektedir.

5.8. cAMP Oluşumunun Değerlendirilmesi

5.8.1. Askorbik Asidin cAMP Oluşumu Üzerine Etkisi

Lee ve ark. (2011) B16F10 melanoma hücrelerinde askorbik asitin cAMP oluşumu üzerine etkisini bir cAMP immünoassay kiti kullanarak araştırmıştır. 37°C'de 1 µM α-MSH ile 1 saat uyarılan hücrelere 0, 50, 100, 200 ve 500 µM dozlarda askorbik asit uygulanarak hücrel cAMP konsantrasyonu ölçülmüştür. Askorbik asitin B16F10 hücrelerinde α-MSH ile indüklenen cAMP seviyelerindeki artışı baskılamadığı belirlenmiştir (150).

Bu tez kapsamında MNT-1 hücreleriyle yapılan çalışmada hücrelere 0,5 µM konsantrasyonda askorbik asit uygulanmıştır ve cAMP miktarı belirlenmiştir. Analiz sonucunda askorbik asit uygulamasının cAMP düzeylerini kontrole göre %15,10 azalttığı belirlenmiştir. Ancak, gruplar arasında cAMP düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenememiştir.

5.8.2. Metforminin cAMP Oluşumu Üzerine Etkisi

Bir sarmal-döngü-sarmal ve lösün fermuar transkripsiyon faktörü olan MITF, melanositlerin hayatta kalması için ana genidir ve PKC, tirozinaz, MART-1, TRP-1 ve DCT gibi ana melanogenik proteinlerin transkripsiyonunu düzenleyen önemli bir faktördür. MITF ekspresyonunun cAMP'ye bağlı bir yolla yukarı regüle edildiği bilinmektedir. α-MSH, melanokortin 1 reseptörüne bağlandığında, hücre içi cAMP seviyeleri, zarla ilişkili adenilat siklaz enziminin aktivasyonu yoluyla yükselir. cAMP'ye bağımlı PKA enzimi daha sonra aktive edilir ve çekirdeğe ulaşarak CREB'i fosforile eder. CREB daha sonra MITF geninin promotör bölgesinde DNA konsensus sekansı CRE'ye bağlanır ve böylece MITF transkripsiyonunu indükler. Bu bilgiden yararlanan Lehraiki ve ark. (2014) melanositlere metformin uygulamasının hücre içi cAMP seviyeleri, PKA aktivasyonu ve CREB fosforilasyonu ile MITF seviyeleri üzerindeki etkilerini incelemiştir (131).

B16 melanoma hücreleri ile yapılan çalışmada hücrelere 24 saat boyunca forskolin veya α -MSH uygulamasının, PKA ve CREB fosforilasyonunu arttırdığı; metforminin ise hem bazal hem de uyarılmış koşullarda protein fosforilasyonu önemli derecede inhibe ettiği belirlenmiştir (131,153).

Metforminin CREB fosforilasyonu üzerindeki etkisi melanoma hücreleri dışında normal insan melanositleri kullanılarak da araştırılmıştır. Kontrol grubu, 5 mM metformin uygulanan grup, 10 mM metformin uygulanan grup, 20 μ M forskolin uygulanan grup, 10 mM metformin+20 μ M forskolin uygulanan grup, 10 μ M α -MSH uygulanan grup ve 10 mM metformin+10 μ M α -MSH uygulanan grupla yapılan çalışmanın sonunda, metforminin melanoma hücreleri ve melanositler üzerindeki depigmente edici etkilerinin CREB aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin, cAMP seviyesi ile alakalı olabileceği hipotezini doğrulamak için metformine yanıt olarak cAMP seviyesi ölçülmüştür. Hem forskolin hem de α -MSH uygulamasının, melanoma hücrelerinde cAMP seviyesini arttırdığı ve maksimum etkinin 6 saatlik uygulamanın sonrasında gözlemlendiği belirlenmiştir. Metformin uygulaması ile forskolin veya α -MSH ile uyarılan koşullarda cAMP birikiminin zamana bağlı bir şekilde azaldığı ve maksimum etkinin 48 saatlik metformin uygulamasından sonra gözlemlendiği bildirilmiştir (131).

MNT-1 hücreleriyle yapılan bu çalışmada hücrelere 50 μ M konsantrasyonda metformin hidroklorür uygulanmış ve cAMP miktarı belirlenmiştir. Analiz sonucunda metformin uygulaması ile cAMP düzeyleri kontrole göre %5,82 ve kombine uygulama ile cAMP düzeyleri kontrole göre %10,68 azalmıştır. Metformin uygulaması sonucunda cAMP düzeylerinin azalması Lehraiki ve ark. (2014)'nın bulgularını desteklemektedir. Ancak, gruplar arasında cAMP düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenememiştir ($p>0,05$; kontrole göre tümü).

5.9. L-DOPA Düzeylerinin Belirlenmesi

5.9.1. Askorbik Asidin L-DOPA Düzeylerine Etkisi

Bilgimiz dahilinde literatürde askorbik asidin melanoma hücrelerindeki L-DOPA düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında MNT-1 hücrelerine 0,5 µM konsantrasyonda askorbik asit uygulamasının L-DOPA düzeylerini kontrole göre %26,82 arttırdığı belirlenmiştir. Askorbik asit uygulaması ile metformin uygulaması arasında L-DOPA düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0,05$).

5.9.2. Metforminin L-DOPA Düzeylerine Etkisi

Tirozin aminoasidinin, tirozinaz enzimi ile L-DOPA'ya oksidasyonu eumelanin ve feomelanin pigmentlerinin biyosentezinin başlangıç noktasıdır. Bu bilgiden yola çıkarak, tez kapsamında tirozinaz düzeylerinin yanı sıra L-DOPA düzeyleri de belirlenmiştir. Bilgimiz dahilinde literatürde metforminin melanoma hücrelerindeki L-DOPA düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

MNT-1 hücrelerine 50 µM konsantrasyonda metformin hidroklorür uygulanmasıyla, L-DOPA düzeyleri kontrole göre değişmemiştir ve kombine uygulama ile L-DOPA düzeylerinin kontrole göre %18,03 azaldığı belirlenmiştir. Askorbik asit uygulaması ile metformin uygulaması arasında L-DOPA düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0,05$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında MNT-1 melanoma hücrelerinde metformin, askorbik asit ve metformin+askorbik asit kombinasyonunun sitotoksikite, hücre içi ROS düzeyleri, tirozinaz düzeyleri, tirozinaz gen ekspresyonu, melanin düzeyleri, cAMP düzeyleri, L-DOPA düzeyleri, sitopatoloji ve tirozinazın immünofloresan olarak işaretlenmesi ile değerlendirilmiş ve aşağıda yer alan sonuçlara ulaşılmıştır:

1. MTT deneyleri sonucunda uygulama dozları askorbik asit için 0,5 μ M ve metformin için 50 μ M olarak belirlenmiştir.
2. Hücre içi ROS tüm çalışma gruplarında kontrole göre artarken, bu artışlar Met (%39,12) ve Asc-Met (%27,35) gruplarında anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, Asc ve Met ve de Asc ve Asc-Met grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklar vardır.
3. Askorbik asit uygulaması ile melanin düzeylerinin kontrole göre %12,01 azaldığı; metformin uygulaması ile melanin düzeylerinin kontrole göre %22,38 ve kombine uygulama ile melanin düzeylerinin kontrole göre %9,24 azaldığı belirlenmiştir. Ancak, gruplar arasında melanin düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$, kontrole göre tümü).
4. Askorbik asit uygulaması cAMP düzeylerini kontrole göre %15,10 azaltmıştır. Metformin uygulaması ile cAMP düzeyleri kontrole göre %5,82 ve kombine uygulama cAMP düzeyleri kontrole göre %10,68 azalmıştır. Ancak, gruplar arasında cAMP düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$, kontrole göre tümü).
5. Askorbik asit uygulaması ile L-DOPA düzeyleri kontrole göre %26,82 artmıştır. Metformin uygulaması ile L-DOPA düzeyleri kontrole göre %0,56 azalmış ve kombine uygulama ile L-DOPA düzeyleri kontrole göre %18,03 artmıştır. Askorbik asit uygulaması ile metformin uygulaması

arasında L-DOPA düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0,05$).

6. Askorbik asit uygulaması ile tirozinaz düzeyleri kontrole göre %13,93 artmıştır. Metformin uygulaması ile tirozinaz düzeyleri kontrole göre %10,14 ve kombine uygulama ile tirozinaz düzeyleri kontrole göre %32 artmıştır. Kombine uygulama ile kontrol grubu arasında tirozinaz düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0,05$).
7. Askorbik asitin tirozinaz gen ekspresyonunu %11 azaltırken, metforminin %3 arttırdığı belirlenmiştir. Kombine uygulama ile tirozinaz gen ekspresyonu %30 artmıştır.
8. Faz kontrast mikroskop ile yapılan sitopatolojik incelemelerde flask tabanına tutunan, fibroblast benzeri iğsi görünümde MNT-1 hücreleri izlenmiştir. Deney gruplarının benzer sayıda hücre içerdiği görülmüştür. MNT-1 hücrelerinin ökromatik çekirdekleri, çekirdek çevresinde sitoplazmada yer yer koyu granüller ve bu granüller nedeniyle sitoplazmanın kahverengi, siyah pigmente görünümde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda sitoplazmasında kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücrelerinin çoğunlukta olduğu görülmüştür. Metformin ve askorbik asit uygulanan grupta kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücrelerinin kontrole kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir. Metformin grubunda bölünemeyen büyük sitoplazmalı hücrelerin yer aldığı belirlenmiştir. Askorbik asit ve metforminin beraber uygulandığı kombine grupta ise kahverengi pigmentasyon gözlenen MNT-1 hücrelerinin kontrol grubu ile benzer yoğunlukta olduğu gözlenmiştir.
9. Anti-tirozinaz ile yapılan indirekt immunfloresan işaretlemede deney gruplarında MNT-1 hücrelerinde sitoplazmada granüller, noktasal işaretlenmeler izlenmiştir. Askorbik asit uygulanan grupta immunfloresan incelemede çok sayıda mitotik hücre izlenmiştir.

Image J programı ile yapılan intensite ölçümlerinde her grup için ortalama CTCF saptanmıştır. Gruplar CTCF açısından karşılaştırıldığında Asc ve Asc+Met gruplarında ortalama CTCF'nin kontrole göre daha yüksek olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.0001$) belirlenmiştir. Ayrıca Asc ve Asc+Met grupları Met grubu ile karşılaştırıldığında Asc ve Asc+Met gruplarında Met grubuna göre CTCF'nin artışı ve bu artışın yine istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.0001$).

Melazmanın tedavisi, hastalığın karmaşık ve çok faktörlü olması nedeniyle son derece zordur. Topikal tedaviler durumu geçici olarak iyileştirebilir, ancak sorun genellikle tekrar eder. Melazma tedavisinin ana prensipleri melanin sentez yollarının inhibisyonu, melanositlerden keratinositlere melanozom transferinin azaltılması ve melaninin ciltten uzaklaştırma yollarının hızlandırılmasıdır. Tedavide mümkün olan en iyi sonucu elde etmek için ideal terapötik yaklaşım, çeşitli patogenetik mekanizmaları birlikte hedef alan tedavi seçeneklerinin kombine olarak kullanılmasıdır. Mevcut çalışmalardan elde edilen sonuçlar kortikosteroid, retinoid ve HQ kombinasyonunu içeren preparatların hiperpigmentasyon tedavisinde en etkili tedavi seçeneği olduğunu göstermektedir. Ancak HQ kullanımına bağlı görülen yan etkiler toksisitesi düşük, etkinliği yüksek yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması gerektiğini gündeme getirmiştir.

Metformin ve askorbik asit gibi zaten kullanımda olan bazı ilaçların “ilaç yeniden konumlandırması” ile farklı alanlarda da kullanılabileceğine dair çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Yeni tedavi seçenekleri arasında olabileceği düşünülen metforminin melazma tedavisinde kullanımına dair literatürde çok fazla veri bulunmamaktadır. İdeal terapötik yaklaşımın patogeneze rol oynayan farklı yollar üzerinden etki gösteren tedavi seçeneklerinin beraber kullanılması olduğu düşüncesiyle bu tez çalışması kapsamında metformin ve askorbik asite ek olarak metformin ve askorbik asit kombinasyonunun sitotoksosite, hücre içi ROS düzeyleri, tirozinaz düzeyleri, tirozinaz gen ekspresyonu, melanin düzeyleri, cAMP düzeyleri, L-DOPA düzeyleri gibi farklı parametreler üzerine etkileri de araştırılmıştır.

MNT-1 hücreleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ortak bir paydada değerlendirildiğinde metforminin askorbik asite göre daha iyi bir tedavi seçeneği olabileceğini, ancak metformin ve askorbik asitin beraber uygulanmasının iyi bir seçenek olmayabileceğini göstermektedir. Bu konuda daha detaylı *in vitro* çalışmaların yapılması gereklidir. *In vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçların hayvan deneyleriyle doğrulanması ve uygun formülasyonların geliştirilmesiyle klinik araştırmaların yapılması metforminin uygun bir tedavi seçeneği olup olmayacağına yönelik daha gerçekçi sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Chuong CM, Nickoloff BJ, Elias PM, Goldsmith LA, Macher E, Maderson PA, ve ark. What is the 'true' function of skin? *Exp Dermatol.* 2002;11(2):159-87.
2. Serre C, Busuttill V, Botto JM. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. *Int J Cosmet Sci.* 2018;40(4):328-347.
3. Dunbar S, Posnick D, Bloom B, Elias C, Zito P, Goldberg DJ. Energy-based device treatment of melasma: An update and review of the literature. *J Cosmet Laser Ther.* 2017;19(1):2-12.
4. Searle T, Al-Niaimi F, Ali FR. The top 10 cosmeceuticals for facial hyperpigmentation. *Dermatol Ther.* 2020;33(6):e14095.
5. Kucuk OS. Current Treatment Approaches for Melasma. *Bezmialem Sci.* 2018;54–62.
6. Sehgal VN, Verma P, Srivastava G, Aggarwal AK, Verma S. Melasma: Treatment strategy. *J Cosmet Laser Ther.* 2011;13(6):265–79.
7. Rodrigues M, Pandya AG. Melasma: Clinical diagnosis and management options. *Australas J Dermatol.* 2015;56(3):151–63.
8. Banavase Channakeshavaiah R, Andanooru Chandrappa NK. Topical metformin in the treatment of melasma: A preliminary clinical trial. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(5):1161–4.
9. Telang P. Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatol Online J.* 2013;4(2):143.
10. Aboul-Einien MH, Kandil SM, Abdou EM, Diab HM, Zaki MSE. Ascorbic acid derivative-loaded modified aspasomes: formulation, in vitro, ex vivo and clinical evaluation for melasma treatment. *J Liposome Res.* 2020;30(1):54–67.
11. Bergfelt DR. Anatomy and Physiology of the Mare. *Equine Breed Manag Artif Insemin.* 2009;113–31.
12. Hee-Young Park MY. Disorders Of Melanocytes- Biology of Melanocytes. In: Wolff, Klaus; Goldsmith Lowell A; Katz, Stephen I.; Gilchrest Barbara A.; Paller, Amy S.;Leffell DJ, editor. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* 7th Editio. McGraw Hill Medical; 2007. p. 591–608.
13. Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S,ve ark. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat.* 2019;234(4):438–55.
14. Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Baltimore).* 2009;37(5):223–6.
15. Bollag WB, Aitkens L, White J, Hyndman KA. Aquaporin-3 in the epidermis: More than skin deep. *Am J Physiol - Cell Physiol.*

- 2020;318(6):C1144–53.
16. Clayton K, Vallejo AF, Davies J, Sirvent S, Polak ME. Langerhans cells-programmed by the epidermis. *Front Immunol.* 2017;8(NOV):1–14.
 17. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014;32(1):3–13.
 18. Knox S, O'Boyle NM. Skin lipids in health and disease: A review. *Chem Phys Lipids.* 2021;236:105055.
 19. Enkhtaivan E, Lee CH. Role of amine neurotransmitters and their receptors in skin pigmentation: Therapeutic implication. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15).
 20. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(5):1–18.
 21. D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1–18.
 22. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *BioFactors.* 2009;35(2):193–9.
 23. Pillaiyar T, Manickam M, Jung SH. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discov Today.* 2017;22(2):282–98.
 24. Maranduca MA, Branisteanu D, Serban DN, Branisteanu DC, Stoleriu G, Manolache N, ve ark. Synthesis and physiological implications of melanic pigments (review). *Oncol Lett.* 2019;17(5):4183–7.
 25. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: Biology and development. *Postep Dermatologii i Alergol.* 2013;30(1):30–41.
 26. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol.* 2013;88(1):76-83.
 27. Fu C, Chen J, Lu J, Yi L, Tong X, Kang L, ve ark. Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol Med Rep.* 2020;21(3):1421–30.
 28. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol.* 2018;98(10):924–31.
 29. Hushcha Y, Blo I, Oton-Gonzalez L, Di Mauro G, Martini F, Tognon M, ve ark. Micrnas in the regulation of melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):1–16.
 30. Giménez García RM, Molina SC. Drug-induced hyperpigmentation: Review and case series. *J Am Board Fam Med.* 2019;32(4):628–38.
 31. Yardman-Frank JM, Fisher DE. Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells. *Exp Dermatol.* 2021;30(4):560–71.
 32. Imokawa G, Yada Y, Kimura M. Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem J.* 1996;314(1):305–12.
 33. Altınok B, Sunguroğlu A. Wnt sinyal yolağı ve kanser. *Ankara Sa.* 2016;15(2):27–38.

34. Widlund HR, Horstmann MA, Roydon Price E, Cui J, Lessnick SL, Wu M, ve ark. β -Catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol.* 2002;158(6):1079–87.
35. Haltaufderhyde K, Ozdeslik RN, Wicks NL, Najera JA, Oancea E. Opsin expression in human epidermal skin. *Photochem Photobiol.* 2015;91(1):117–23.
36. Regazzetti C, Sormani L, Debayle D, Bernerd F, Tulic MK, De Donatis GM, ve ark. Melanocytes Sense Blue Light and Regulate Pigmentation through Opsin-3. *J Invest Dermatol.* 2018;138(1):171–8.
37. Shin SH, Lee YM. Glyceollins, a novel class of soybean phytoalexins, inhibit SCF-induced melanogenesis through attenuation of SCF/c-kit downstream signaling pathways. *Exp Mol Med.* 2013;45(2):1–9.
38. Rönstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(19–20):2535–48.
39. Lu Y, Tonissen KF, Di Trapani G. Modulating skin colour: Role of the thioredoxin and glutathione systems in regulating melanogenesis. *Biosci Rep.* 2021;41(5):1–12.
40. Dong L, Li Y, Cao J, Liu F, Pier E, Chen J, ve ark. FGF2 regulates melanocytes viability through the STAT3-transactivated PAX3 transcription. *Cell Death Differ.* 2012;19(4):616–22.
41. Zhang Y, Xia M, Jin K, Wang S, Wei H, Fan C, ve ark. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer.* 2018;17(1):1–14.
42. Choi W, Kolbe L, Hearing VJ. Characterization of the bioactive motif of neuregulin-1, a fibroblast-derived paracrine factor that regulates the constitutive color and the function of melanocytes in human skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25(4):477–81.
43. Botchkarev VA. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J Invest Dermatol.* 2003;120(1):36–47.
44. Park H-Y, Wu C, Yaar M, Stachur CM, Kosmadaki M, Gilchrest BA. Role of BMP-4 and Its Signaling Pathways in Cultured Human Melanocytes. *Int J Cell Biol.* 2009;2009:1–11.
45. Yaar M, Wu C, Park HY, Panova I, Schutz G, Gilchrest BA. Bone morphogenetic protein-4, a novel modulator of melanogenesis. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25307–14.
46. Babbush KM, Babbush RA, Khachemoune A. Treatment of melasma: a review of less commonly used antioxidants. *Int J Dermatol.* 2021;60(2):166–73.
47. Zhu Y, Zeng X, Ying J, Cai Y, Qiu Y, Xiang W. Evaluating the quality of life among melasma patients using the MELASQoL scale: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2022;17(1):e0262833.

48. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: A clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol*. 2014;89(5):771–82.
49. Tzouveka E. Epidemiology and Risk Factors of Melasma. *J Pigment Disord*. 2015;s4:10–2.
50. Ogbachie-Godec OA, Elbuluk N. Melasma: an Up-to-Date Comprehensive Review. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017;7(3):305–18.
51. Rajanala S, Maymone MB de C, Vashi NA. Melasma pathogenesis: a review of the latest research, pathological findings, and investigational therapies. *Dermatol Online J*. 2019;25(10):0–6.
52. Slominski RM, Sarna T, Płonka PM, Raman C, Brożyna AA, Slominski AT. Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship. *Front Oncol*. 2022;12(March):1–18.
53. Jou PC, Feldman RJ, Tomecki KJ. UV protection and sunscreens: What to tell patients. *Cleve Clin J Med*. 2012;79(6):427–36.
54. Rachmin I, Ostrowski SM, Weng QY, Fisher DE. Topical treatment strategies to manipulate human skin pigmentation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;153:65–71.
55. Sarkar R, Devadasan S, Choubey V, Goswami B. Melatonin and oxidative stress in melasma – an unexplored territory; a prospective study. *Int J Dermatol*. 2020;59(5):572–5.
56. Vashisht D. Minocycline induced hyperpigmentation in lepromatous patches: case report. *J Dermatology Cosmetol*. 2018;2(5):81–2.
57. Sonthalia S. Melasma: A Monograph. *Melasma A Monogr*. 2015;(March).
58. Natale CA, Duperret EK, Zhang J, Sadeghi R, Dahal A, O'Brien KT, ve ark. Sex steroids regulate skin pigmentation through nonclassical membrane-bound receptors. *Elife*. 2016;5:e15104.
59. Roberts W. Air pollution and skin disorders. *Int J Women's Dermatology*. 2021;7(1):91–7.
60. Kwon SH, Hwang YJ, Lee SK, Park KC. Heterogeneous pathology of Melasma and its clinical implications. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
61. Vachtenheim J, Borovanský J. “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: Central role of MITF. *Exp Dermatol*. 2010;19(7):617–27.
62. Ohbayashi N, Fukuda M. Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-608.
63. Wang Y, Zhao J, Jiang L, Mu Y. The application of skin care product in melasma treatment. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021;14:1165–71.
64. Sarkar R, Arora P, Garg V, Sonthalia S, Gokhale N. Melasma update. *Indian Dermatol Online J*. 2014;5(4):426.
65. Passeron T, Lim HW, Goh CL, Kang HY, Ly F, Morita A, ve ark.

- Photoprotection according to skin phototype and dermatoses: practical recommendations from an expert panel. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2021;35(7):1460–9.
66. Brenner M, Hearing JV. The protective role of melanin against UV. *Photochem Photobiol.* 2008;84(3):539–49.
 67. Liu Y, Wu S, Wu H, Liang X, Guo D, Zhuo F. Comparison of the Efficacy of Melasma Treatments: A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:713554.
 68. Rivas S, Pandya AG. Treatment of melasma with topical agents, peels and lasers: An evidence-based review. *Am J Clin Dermatol.* 2013;14(5):359–76.
 69. Truchuelo M, Cerdá P, Fernández LF. Chemical Peeling: A Useful Tool in the Office. *Actas Dermosifiliogr.* 2017;108(4):315–22.
 70. Soleymani T, Lanoue J, Rahman Z. A practical approach to chemical peels: A review of fundamentals and step-by-step algorithmic protocol for treatment. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2018;11(8):21–8.
 71. Trivedi MK, Yang FC, Cho BK. A review of laser and light therapy in melasma. *Int J Womens Dermatol.* 2017;3(1):11-20.
 72. Dogra S, Kanwar AJ, Parsad D. Adapalene in the treatment of melasma: a preliminary report. *J Dermatol.* 2002 Aug;29(8):539-40.
 73. Bandyopadhyay D. Topical treatment of melasma. *Indian J Dermatol.* 2009;54(4):303-9.
 74. Morag M, Nawrot J, Siatkowski I, Adamski Z, Fedorowicz T, Dawid-Pac R, et al. A double-blind, placebo-controlled randomized trial of *Serratulae quinquefoliae folium*, a new source of β -arbutin, in selected skin hyperpigmentations. *J Cosmet Dermatol.* 2015;14(3):185–90.
 75. Farshi S. Comparative study of therapeutic effects of 20% azelaic acid and hydroquinone 4% cream in the treatment of melasma. *J Cosmet Dermatol.* 2011;10(4):282–7.
 76. Mazurek K, Pierzchała E. Comparison of efficacy of products containing azelaic acid in melasma treatment. *J Cosmet Dermatol.* 2016;15(3):269–82.
 77. Adalatkah H, Sadeghi-Bazargani H. The first clinical experience on efficacy of topical flutamide on melasma compared with topical hydroquinone: A randomized clinical trial. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4219–25.
 78. Hurley ME, Guevara IL, Gonzales RM, Pandya AG. Efficacy of glycolic acid peels in the treatment of Melasma. *Arch Dermatol.* 2002;138(12):1578–82.
 79. Dayal S, Sahu P, Dua R. Combination of glycolic acid peel and topical 20% azelaic acid cream in melasma patients: efficacy and improvement in quality of life. *J Cosmet Dermatol.* 2017;16(1):35–42.
 80. Kumari R, Thappa D. Comparative study of trichloroacetic acid versus glycolic acid chemical peels in the treatment of melasma. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2010;76(4):447.

81. Khunger N, Sarkar R, Jain RK, Koppel RA. Tretinoin peels versus glycolic acid peels in the treatment of melasma in dark-skinned patients. *Dermatologic Surg.* 2004;30(5):756–60.
82. Kang MH, Jang GY, Ji YJ, Lee JH, Choi SJ, Hyun TK, ve ark. Antioxidant and anti-melanogenic activities of heat-treated licorice (*Wongam, glycyrrhiza glabra* × *g. uralensis*) extract. *Curr Issues Mol Biol.* 2021;43(2):1171–87.
83. Zhu W, Gao J. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2008;13(1):20–4.
84. Amer M, Metwalli M. Topical liquiritin improves melasma. *Int J Dermatol.* 2000;39(4):299–301.
85. Guevara IL, Pandya AG. Safety and efficacy of 4% hydroquinone combined with 10% glycolic acid, antioxidants, and sunscreen in the treatment of melasma. *Int J Dermatol.* 2003;42(12):966–72.
86. Tse TW. Hydroquinone for skin lightening: Safety profile, duration of use and when should we stop? *J Dermatolog Treat.* 2010;21(5):272–5.
87. Williams H. Skin lightening creams containing hydroquinone. *Br Med J.* 1992;305(6859):903–4.
88. Lajis AF, Hamid M, Ariff AB. Depigmenting effect of Kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:952452.
89. Draelos ZD. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatol Ther.* 2007;20(5):308–13.
90. Eshghi G, Khezrian L, Ashari FE. Comparison between intralesional triamcinolone and Kligman’s formula in treatment of melasma. *Acta Med Iran.* 2016;54(1):67–71.
91. Nassar AAE, Ibrahim A shimaa M, Mahmoud AA. Efficacy and safety of intralesional steroid injection in the treatment of melasma. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20(3):862–867.
92. Kasraee B, Hügin A, Tran C, Sorg O, Saurat JH. Methimazole is an inhibitor of melanin synthesis in cultured B16 melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1338–41.
93. Kasraee B, Handjani F, Parhizgar A, Omrani GR, Fallahi MR, Amini M, ve ark. Topical methimazole as a new treatment for postinflammatory hyperpigmentation: Report of the first case. *Dermatology.* 2005;211(4):360–2.
94. Navarrete-Solís J, Castanedo-Cázares JP, Torres-Álvarez B, Oros-Ovalle C, Fuentes-Ahumada C, González FJ, ve ark. A double-blind, randomized clinical trial of niacinamide 4% versus hydroquinone 4% in the treatment of melasma. *Dermatol Res Pract.* 2011;2011:379173.
95. Matsui MS, Petris MJ, Niki Y, Karaman-Jurukovska N, Muizzuddin N, Ichihashi M, ve ark. Omeprazole, a gastric proton pump inhibitor, inhibits

- melanogenesis by blocking ATP7A trafficking. *J Invest Dermatol.* 2015;135(3):834–41.
96. Baek SH, Lee SH. Proton pump inhibitors decrease melanogenesis in melanocytes. *Biomed Rep.* 2015;3(5):726-730.
 97. Kang HY, Valerio L, Bahadoran P, Ortonne JP. The role of topical retinoids in the treatment of pigmentary disorders: An evidence-based review. *Am J Clin Dermatol.* 2009;10(4):251–60.
 98. Piętownska Z, Nowicka D, Szepletowski JC. Understanding Melasma-How Can Pharmacology and Cosmetology Procedures and Prevention Help to Achieve Optimal Treatment Results? A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(19):12084.
 99. Madan Mohan NT, Gowda A, Jaiswal AK, Sharath Kumar BC, Shilpashree P, Gangaboraiah B, ve ark. Assessment of efficacy, safety, and tolerability of 4-n-butylresorcinol 0.3% cream: An indian multicentric study on melasma. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2016;9:2–21.
 100. Huh SY, Shin JW, Na JI, Huh CH, Youn SW, Park KC. Efficacy and safety of liposome-encapsulated 4-n-butylresorcinol 0.1% cream for the treatment of melasma: A randomized controlled split-face trial. *J Dermatol.* 2010;37(4):311–5.
 101. Grimes PE. The safety and efficacy of salicylic acid chemical peels in darker racial-ethnic groups. *Dermatologic Surg.* 1999;25(1):18–22.
 102. Kodali S, Guevara IL, Carrigan CR, Daulat S, Blanco G, Boker A, ve ark. A prospective, randomized, split-face, controlled trial of salicylic acid peels in the treatment of melasma in Latin American women. *J Am Acad Dermatol.* 2010;63(6):1030–5.
 103. Mansouri P, Farshi S, Hashemi Z, Kasraee B. Evaluation of the efficacy of cysteamine 5% cream in the treatment of epidermal melasma: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Br J Dermatol.* 2015;173(1):209–17.
 104. Johnson B, Marrone S, Om A. Novel Combination of a 650-Microsecond Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet 1,064-nm Laser and Cysteamine Cream for the Treatment of Melasma: A Case Study. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2020;13(3):28–30.
 105. Lima PB, Dias JAF, Cassiano DP, Esposito ACC, Miot LDB, Bagatin E, ve ark. Efficacy and safety of topical isobutylamido thiazolyl resorcinol (Thiamidol) vs. 4% hydroquinone cream for facial melasma: an evaluator-blinded, randomized controlled trial. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2021;35(9):1881–7.
 106. Arrowitz C, Schoelermann AM, Mann T, Jiang LI, Weber T, Kolbe L. Effective Tyrosinase Inhibition by Thiamidol Results in Significant Improvement of Mild to Moderate Melasma. *J Invest Dermatol.* 2019;139(8):1691-1698.e6.
 107. Ali FR. Oral tranexamic acid for the treatment of melasma. *Clin Exp*

- Dermatol. 2019;44(3):347–9.
108. Sharma R, Mahajan VK, Mehta KS, Chauhan PS, Rawat R, Shiny TN. Therapeutic efficacy and safety of oral tranexamic acid and that of tranexamic acid local infiltration with microinjections in patients with melasma: a comparative study. *Clin Exp Dermatol.* 2017;42(7):728–34.
 109. Tehranchinia Z, Saghi B, Rahimi H. Evaluation of Therapeutic Efficacy and Safety of Tranexamic Acid Local Infiltration in Combination with Topical 4% Hydroquinone Cream Compared to Topical 4% Hydroquinone Cream Alone in Patients with Melasma: A Split-Face Study. *Dermatol Res Pract.* 2018;2018:8350317.
 110. Soliman MM, Ramadan SAR, Bassiouny DA, Abdelmalek M. Combined trichloroacetic acid peel and topical ascorbic acid versus trichloroacetic acid peel alone in the treatment of melasma: A comparative study. *J Cosmet Dermatol.* 2007;6(2):89–94.
 111. Abdel-Meguid AM, Taha EA, Ismail SA. Combined jessner solution and trichloroacetic acid versus trichloroacetic acid alone in the treatment of melasma in dark-skinned patients. *Dermatologic Surg.* 2017;43(5):651–6.
 112. Kandil SM, Soliman II, Diab HM, Bedair NI, Mahrous MH, Abdou EM. Magnesium ascorbyl phosphate vesicular carriers for topical delivery; preparation, in-vitro and ex-vivo evaluation, factorial optimization and clinical assessment in melasma patients. *Drug Deliv.* 2022;29(1):534–47.
 113. Al-Niaimi F, Chiang NYZ. Topical Vitamin C and the Skin: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2017;10(7):14–17.
 114. Ismail ESA, Patsatsi A, Abd el-Maged WM, Nada EEDA el A. Efficacy of microneedling with topical vitamin C in the treatment of melasma. *J Cosmet Dermatol.* 2019;18(5):1342–7.
 115. Lee GSK. Intravenous vitamin C in the treatment of post-laser hyperpigmentation for melasma: A short report. *J Cosmet Laser Ther.* 2008;10(4):234–6.
 116. Westerhof W, Kooyers TJ. Hydroquinone and its analogues in dermatology - a potential health risk. *J Cosmet Dermatol.* 2005;4(2):55–9.
 117. Rao GS. Glutathionyl hydroquinone: A potent pro-oxidant and a possible toxic metabolite of benzene. *Toxicology.* 1996;106(1–3):49–54.
 118. Tezel H, Balcı A, Erkekoğlu P. Melazma Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar Ve Olası Toksik Etkileri. *Hacettepe Univ J Fac Pharm.* 2022;42(2):105–20.
 119. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Kozmetik Yönetmeliği [Internet]. 2005 [08.01.2023]. Erişim adresi: <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=8157&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>
 120. ATCC. MNT-1 CRL-3450TM [Internet]. 2021[08.01.2023] Erişim adresi: <https://www.atcc.org/products/crl-3450>
 121. Chen KG, Leapman RD, Zhang G, Lai B, Valencia JC, Cardarelli CO, ve ark.

- Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(18):1256–71.
122. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Liu A, ve ark. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* 2004;64(15):5270–82.
 123. Li M, Li X, Zhang H, Lu Y. Molecular Mechanisms of Metformin for Diabetes and Cancer Treatment. *Front Physiol.* 2018;9:1039.
 124. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care.* 1989;12(8).
 125. Jaune E, Rocchi S. Metformin: Focus on Melanoma. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:472.
 126. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, ve ark. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2005;18(3):283–93.
 127. Horman S, Browne GJ, Krause U, Patel J V., Vertommen D, Bertrand L, ve ark. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol.* 2002;12(16):1419–23.
 128. Loubiere C, Clavel S, Gilleron J, Harisseh R, Fauconnier J, Ben-Sahra I, ve ark. The energy disruptor metformin targets mitochondrial integrity via modification of calcium flux in cancer cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–9.
 129. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A, ve ark. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis.* 2011;2(9):e199-10.
 130. Miller RA, Birnbaum MJ. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2267–70.
 131. Lehraiki A, Abbe P, Cerezo M, Rouaud F, Regazzetti C, Chignon-Sicard B, ve ark. Inhibition of melanogenesis by the antidiabetic metformin. *J Invest Dermatol.* 2014;134(10):2589–97.
 132. de Freitas ACP, Rigon RB, Bagatin E, Leonardi GR. Perspectives of topical formulations for melasma. *Int J Dermatol.* 2022;
 133. Walingo MK. Role of Vitamin C (Ascorbic Acid) on Human Health- A Review. *African J Food, Agric Nutr Dev.* 2005;5(8):01–12.
 134. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* 2007;274(1):1–22.
 135. Sheraz MA, Ahmed S, Ahmad I, Shaikh RH, Vaid FHM, Iqbal K. Formulation and stability of ascorbic acid in topical preparations. *Syst Rev Pharm.* 2011;2(2):86–90.
 136. Wang K, Jiang H, Li W, Qiang M, Dong T, Li H. Role of Vitamin C in Skin Diseases. *Front Physiol.* 2018;9:819.
 137. Elabscience. Human TYR(Tyrosinase) ELISA Kit [Internet]. 2022

- [08.01.2023]. Erişim adresi: <https://www.elabscience.com/PDF/Cate61/E-EL-H1665-Elabscience.pdf>
138. Elabscience. cAMP(Cyclic adenosine monophosphate) ELISA Kit [Internet]. 2018 [08.01.2023]. Erişim adresi: https://file.elabscience.com/Manual/elisa_kits/E-EL-0056.pdf
 139. Sigma Aldrich. Fluorometric Intracellular ROS Kit MAK144 [Internet]. 2014 [08.01.2023]. Erişim adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/641/780/mak144bul.pdf>
 140. Kadri, K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In: Nagpal, M. L., Boldura, O., Baltă, C., Enany, S. , editors. Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science [Internet]. London: IntechOpen; 2019 [08.01.2023]. Erişim adresi: <https://www.intechopen.com/chapters/67558>
 141. Taube JM, Akturk G, Angelo M, Engle EL, Gnjjatic S, Greenbaum S, ve ark. The Society for Immunotherapy in Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1).
 142. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:299-311.
 143. Santa Cruz Biotechnology. Tyrosinase Antibody (T311): sc-20035 [Internet]. 2022 [08.01.2023]. Erişim adresi: <https://www.scbt.com/p/tyrosinase-antibody-t311>
 144. Abcam. Goat Anti-Mouse IgG H & L [Internet]. 2022 [08.01.2023]. Erişim adresi: <https://www.abcam.com/goat-mouse-igg-hl-fitc-ab6785.html>
 145. Kwon SH, Na JI, Choi JY, Park KC. Melasma: Updates and perspectives. *Exp Dermatol*. 2019;28(6):704–8.
 146. Kagha K, Fabi S, Goldman MP. Melasma’s Impact on Quality of Life. *J Drugs Dermatol*. 2020;19(2):184–7.
 147. Gupta AK, Gover MD, Nouri K, Taylor S. The treatment of melasma: A review of clinical trials. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(6):1048–65.
 148. Apridamayanti P, Listiyana N, Desnita R. Formulation vitamin C using niosomes system span 80 in gel for increase stability and penetration in vitro. *Int J PharmTech Res*. 2016;9(2):81–8.
 149. Panich U, Tangsupa-A-Nan V, Onkoksoong T, Kongtaphan K, Kasetsinsombat K, Akarasereenont P, ve ark. Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system. *Arch Pharm Res*. 2011;34(5):811–20.
 150. Lee SA, Son YO, Kook SH, Choi KC, Lee JC. Ascorbic acid increases the activity and synthesis of tyrosinase in B16F10 cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Arch Dermatol Res*. 2011;303(9):669–78.
 151. Choi YK, Rho YK, Yoo KH, Lim YY, Li K, Kim BJ, ve ark. Effects of vitamin C vs. multivitamin on melanogenesis: Comparative study in vitro and

- in vivo. *Int J Dermatol.* 2010;49(2):218–26.
152. Oscilowska I, Rolkowski K, Baszanowska W, Huynh TYL, Lewoniewska S, Nizioł M, et al. Proline Dehydrogenase/Proline Oxidase (PRODH/POX) Is Involved in the Mechanism of Metformin-Induced Apoptosis in C32 Melanoma Cell Line. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4).
 153. Belisle ES, Park HY. Metformin: A potential drug to treat hyperpigmentation disorders. *J Invest Dermatol.* 2014;134(10):2488–91.

Ek-2: Orijinallik Raporu

MELAZMA TEDAVİSİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR VE OLASI TOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 12	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 4
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
3	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	acikerisim.harran.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	patentimages.storage.googleapis.com İnternet Kaynağı	<% 1
9	acikerisim.pau.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

9. ÖZGEÇMİŞ

