

Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkileri

Burcu Menekşe BALKAN¹, Tevhide SEL²

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Burdur; ² Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

Özet: Kanser araştırmalarında yapılan çalışmalar, apoptozisin kanser gelişiminde ve tedaviye cevapta önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Sunulan çalışmada güçlü bir antioksidan olan Vitamin C'nin farklı dozlarının hepatoselüler karsinom hücrelerindeki hücre canlılığına ve apoptotik hücre ölümüne etkileri incelenmiştir. Apoptozis belirteçlerinden, sitokrom c, kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri hücre canlılığında azalmanın olduğu 31,3 mM Vitamin C konsantrasyonu ile hücre çoğalmasında belirgin artışın gözleendiği 0,313 mM ve 3,13 mM Vitamin C konsantrasyonlarında belirlenmiştir. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 1, 3 ve 9 enzim aktivitelerinde istatistik olarak önemli bir artış gözlenmemiştir. Ancak 0,313 mM ve 31,3 mM Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 3 enzim aktivitelerinde (%53 ve %57) istatistik olarak önemli azalma meydana gelmiştir. 0,313 mM, 3,13 mM, 31,3 mM konsantrasyonlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinin sitoplazmik ve mitokondriyal sitokrom c düzeylerinde istatistik anlamda bir değişim gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde şekillenen hücre ölümü kaspaz bağımsız olarak şekillenmektedir. Meydana gelen hücre ölümü mitokondriden bazı apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınımı ile şekillenen diğer hücre ölüm yolları ile ilişkilendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Apoptozis, HepG2, kaspaz, vitamin C, sitokrom c.

The effects of vitamin C on apoptosis in HepG2 cells

Summary: Studies in cancer research show that apoptosis plays a major role in both tumor formation and treatment response. The effects of different doses of Vitamin C, is an antioxidant, on cell proliferation and apoptosis in HepG2 cells were investigated. As an indicator of apoptosis, caspases 1, 3 and 9 enzyme activity and cytochrome c levels were determined at 31,3 mM Vitamin C concentration which reduced the cell viability significantly and at 3,13 mM and 0,313 mM Vitamin C concentrations which show significant increase of cell viability. There were no significant increase in caspases 1, 3 and 9 activity in Vitamin C treated HepG2 cells. However the caspases 3 activity decreased in HepG2 cells treated with 0,313 mM and 31,3 mM Vitamin C (53% and 57%) significantly. No statistic changes was observed in cytoplasmic and mitochondrial cytochrome c levels in HepG2 cells treated with 0,313 mM, 3,13 mM, 31,3 mM Vitamin C. In conclusion, caspases- independent cell death occurs in different doses of Vitamin C applied HepG2 cells. It may be related to release of some apoptotic proteins from mitochondria to cytosol.

Key words: Apoptosis, caspase, HepG2, vitamin C, cytochrome c.

Giriş

Malign hastalıklar hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının kontrolsüz ve aşırı olduğu hastalıklar olarak tanımlanır. Ancak malignite gelişiminde aşırı çoğalmanın yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da rol oynadığını görülmüştür. Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptozise gidemeyen hücreler malign hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (19).

Vitamin C suda çözünen bir vitamin olup, enzimatik olmayan antioksidandır (17), diğer suda çözünen antioksidanlar gibi plazmada bulunan radikallere karşı ilk koruyucu sistem olarak hareket eder. Güçlü antioksidan özelliğinin yanında Vitamin C indirgeyici ajan, serbest radikal yakalayıcı ve enzim kofaktörü olarak fizyolojik olaylarda önemli bir rol oynamaktadır (18). Vitamin C bazı kanser türlerine karşı koruyucu etkisi olduğu

bildirilen birkaç vitaminden biridir (4). Kanserden koruyucu etkinliğinin yanında Vitamin C'nin malignant hücre hatlarında sitotoksik etkinliği bildirilmiştir (9). Genel olarak sitotoksik bir ajan olarak düşünülmesine de, son yıllarda yapılan çalışmalarda farmakolojik dozlardaki (0,3-20 mM) askorbat, askorbat radikalleri ve H₂O₂ oluşumu ile kanser hücrelerinde seçici olarak toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (3).

Bu çalışmada güçlü bir antioksidan olan Vitamin C'nin farklı dozlarının hepatoselüler karsinom hücrelerindeki hücre canlılığına ve apoptotik hücre ölümüne etkileri incelenmiştir. Hepatoselüler karsinom hücrelerindeki hücre canlılığına etkileri hücre çoğalma testi ile apoptotik hücre ölümüne etkileri ise sitokrom c, kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivite analizleri ile belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışmada hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücreleri kullanılmıştır (ATCC Cat No. HB-8065). Hücreler % 10 Fetal Dana Serum (FBS), 50 mg/l Gentamisin sülfat ve 300 mg/l L-glutamin içeren RPMI 1640 Medium besi ortamı içerisinde, 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkubatoründe üretilmiştir.

Hücre canlılık testine göre, 100 000 hücre / kuyucuk ve 24 saat inkubasyon süresi HepG2 hücreleri için optimum üreme şartları olarak belirlenmiş ve diğer analizler bu şartlarda gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin üzerine 0,000313 mM - 625 mM aralığında bir seri farklı konsantrasyonlarda Vitamin C içeren 100 µM besiyeri ilave edilerek Bio Vision Quickcell proliferasyon assay ticari kiti (cat no: K301) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiş ve kaspaz enzim aktivitesi ve sitokrom c analizleri için uygulanacak dozlar bu sonuçlara göre belirlenmiştir. Kontrol grubu hücrelere Vitamin C uygulaması yapılmamıştır. Bu sonuçlara göre hücre canlılığında kontrol grubuna göre azalmanın olduğu 31,3 mM Vitamin C konsantrasyonu ve kontrol hücrelerine göre hücre çoğalmasında belirgin artışın gözlemlendiği 0,313 mM ve 3,13 mM Vitamin C konsantrasyonunun da sitokrom c, kaspaz 1, 3 ve 9 enzim analizleri için uygulanacak dozlar olarak belirlenmiştir.

Kaspaz 1, 3 ve 9 Analizleri: Kaspaz 1 (cat no:K111), kaspaz 3 (cat no: K106) ve kaspaz 9 (cat no:K119) analizleri "BioVision kaspaz colorimetric assay" kitleri ile gerçekleştirilmiştir. Hücre lizatlarında protein tayini ile konsantrasyonları ayarlanmıştır. Hücrelerden elde edilen lizatlarda protein konsantrasyonu ayarlaması için protein miktar tayini Bradford yöntemi ile tespit edilmiştir (2).

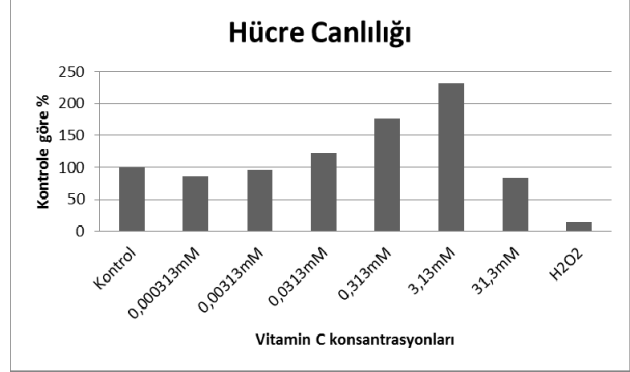
Sitokrom c tayini, hücre lizatının sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonları "BioVision kiti, cat no: K257" ile hazırlanarak, Western Blot ile analiz edilmiştir. Hücre lizatının sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonları SDS-PAGE ile (13) ayırımı yapılarak, Western Blot ile analiz edilmiştir.

İstatistik Analizi, ölçüm değerleri bakımından gruplar arası farklılığın önemliliğini incelemek için non parametrik Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Farklılığın hangi gruplar arasında kaynaklandığını bulmak için çoklu karşılaştırma testi olarak birden fazla Mann-Whitney Testi uygulanmış ve Bonferonni düzeltmesi yapılmıştır (20).

Bulgular

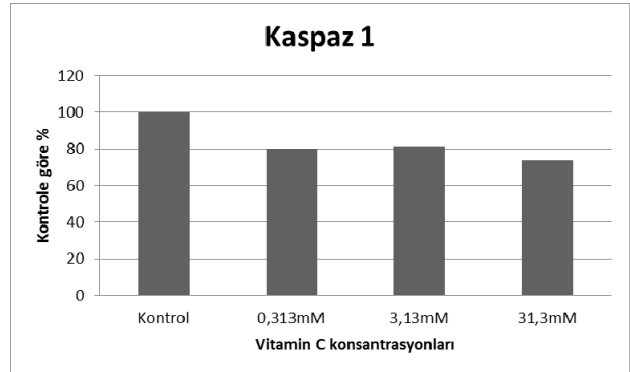
Vitamin C'nin farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı % değerleri Şekil 1'de verilmiştir. 0,0313 mM Vitamin C konsantrasyonundan itibaren kontrole göre hücre canlılığında bir artış gözlenmiştir. Bu artış 0,313 mM ile 3,13 mM Vitamin C

konsantrasyonlarında sırasıyla % 177 ve % 231 değerlerine ulaşmıştır. HepG2 hücrelerinde kontrole göre hücre canlılığında görülen yaklaşık 2 kat artış, Vitamin C'nin artan konsantrasyonları ile düşmeye başlamıştır. 31,3 mM Vitamin C konsantrasyonunda kontrol grubuna göre hücre canlılığı % 84 bulunmuştur.



Şekil 1. Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkileri. (24 saat).

Figure 1. The effects of Vitamine C on cells viability in HepG2 cells. (24 hours).



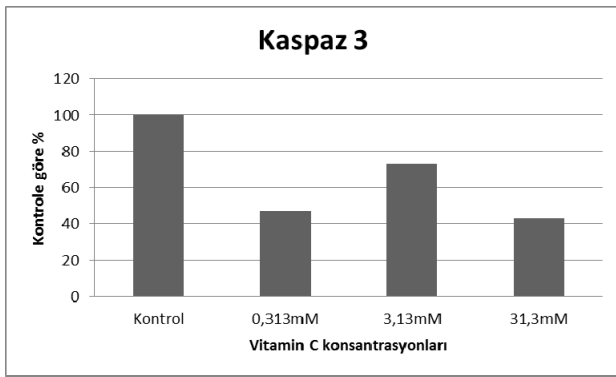
Şekil 2. Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde kaspaz 1 düzeylerine etkileri.

Figure 2. The effects of Vitamin C on caspase 1 levels in HepG2 cells.

Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 1 enzim aktiviteleri Şekil 2 'de verilmiştir. 0,313 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM dozlarında Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre sırasıyla % 19,8, % 18,7 ve % 26,05 azalmıştır. Kaspaz aktivitesindeki bu azalış istatistik olarak anlamlı değildir. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 3 enzim aktiviteleri Şekil 3'de verilmiştir. Kaspaz 3'ün aktivasyonu 0,313 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM Vitamin C uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre sırası ile % 43, % 27 ve % 47 azalmıştır. 0,313 mM ve 31,3 mM Vitamin C uygulanan hücrelerde kaspaz 3 aktivitesindeki azalış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,005).

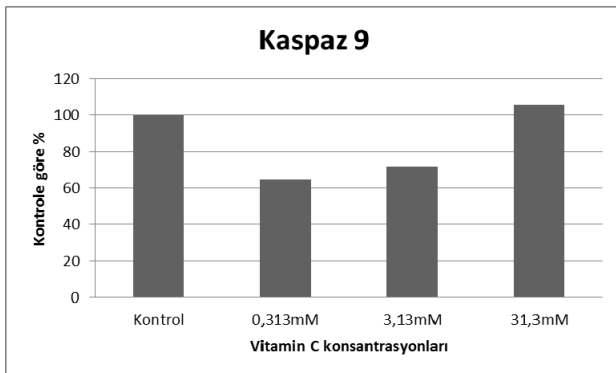
Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 9 enzim aktiviteleri Şekil 4'de verilmiştir. Kaspaz 9'un aktivitesi 0,313 mM ve 3,13 mM Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre sırasıyla % 35, % 28 azalmış, 31,3 mM uygulanan hücrelerde ise % 6 artmıştır. Kaspaz 9 aktivitesindeki değişiklikler istatistik olarak anlamlı değildir.

Hücrelerde mitokondriyal lokalize olan Sitokrom c'nin mitokondriyal fraksiyonuna ait Western Blot analize ait bantlar sitoplazmik fraksiyona göre daha belirgin olarak görülmektedir (Şekil 5 ve Tablo 1). Vitamin C'nin 3,13 mM ve 31,3 mM dozlarında uygulandığı HepG2 hücrelerinin mitokondriyal fraksiyonundaki sitokrom c bantları kontrole göre daha yoğun gözlenmiştir.



Şekil 3. Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde kaspaz 3 düzeylerine etkileri.

Figure 3. The effects of Vitamin C on caspase 3 levels in HepG2 cells.



Şekil 4. Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde kaspaz 9 düzeylerine etkileri.

Figure 4. The effects of Vitamin C on caspase 9 levels in HepG2 cells.



Şekil 5. Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde sitokrom c düzeylerine etkileri (Western Blot analiz sonuçları).

Figure 5. The effects of Vitamin C on cytochrome c levels in HepG2 cells (Results of Western Blot analyses).

Tablo 1. Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde sitokrom c'nin western blot analiz sonuçlarının dansitometrik analizi. (OD).

Table 1. Dansitometric analysis of the results of cytochrome c by western blot in HepG2 cells treated with Vitamin C (OD).

Sitozolik				Mitokondriyal			
Kontrol	3,13 mM	313 mM	0,313 mM	Kontrol	3,13 mM	31,3 mM	0,313 mM
Vit C	Vit C	Vit C	Vit C	Vit C	Vit C	Vit C	Vit C
0,64	0,55	0,53	0,50	0,61	0,63	0,66	0,59

OD: Optik Dansite

Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Vitamin C'nin kanser hücrelerinde prooksidan etki göstererek, oksidatif stres oluşturduğu bildirilmiştir (3). Shinozaki ve ark. (2011) HL60 insan lösemi hücre hattında farklı konsantrasyonlarda (0,1 mM - 20 mM) askorbik asit uygulamasının canlı hücre sayısındaki etkilerini incelemişler ve 0,1 mM askorbik asitin canlı hücre sayısında kontrole göre bir değişiklik meydana getirmediğini bildirmişlerdir. Bunun yanında, aynı çalışmada 0,5 mM ve üzeri askorbik asit uygulaması, doz bağımlı olarak canlı hücre sayısını azaltmıştır. 24 saatlik inkübasyon yapılan bu çalışmada, 1 mM üzeri konsantrasyonda askorbik asit uygulaması yapılan hücrelerde, hücre canlılığında görülen azalma istatistik olarak anlamlı bulunmuştur. HL60 hücreleri ve HepG2 hücreleri karşılaştırıldığında HL60 hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlardaki Vitamin C uygulamalarında canlı hücre sayısında büyük oranda azalma gözlenmiştir. HepG2 hücrelerinde ise canlı hücre sayısında 3,13 mM askorbik asit uygulanan hücrelerde kontrole göre (%231) artış gözlenmiştir.

Pankreas kanser hücrelerinde 50 µM -200 µM konsantrasyonlardaki Asc-S'in 24 saat uygulanması bu hücrelerde doz bağımlı olarak hücre çoğalmasını kontrol grubu hücrelerine göre belirgin bir şekilde inhibe etmiştir. Aynı çalışmada 24 saat 150 µM Asc-S uygulanan hücrelerde apoptozisin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir (11). HA22T/VGH hücrelerine arjinin ve askorbik asit uygulandığı başka bir çalışmada ise, arjininin 5,74 mM gibi yüksek dozunun 24 saatlik uygulandığında hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki göstermezken, 0,854 mM askorbik asit uygulanan hücrelerde hücre canlılığında kontrol grubu hücrelerine göre % 28'lik bir azalma olduğu belirtilmiştir (6).

Vitamin C'nin etkileri uygulanan doza ve hücre hattına bağlı olarak değişmektedir. HepG2 hücrelerinde 1-100 μM (24, 48, 72 saat) Vitamin C uygulamasında sitotoksik etki gözlenmezken, HL-60 hücrelerinde 50-100 μM (72 saat) Vitamin C uygulaması hücre canlılığında doz bağımlı bir azalma göstermiştir. Hücre canlılığında görülen bu azalma 50 μM Vitamin C uygulanan HL-60 hücrelerinde % 29 iken, 100 μM Vitamin C uygulanan HL-60 hücrelerinde % 46'dır. Yine aynı çalışmada 5-50 μM Vitamin C uygulanan HepG2 ve HL-60 hücrelerinde flow sitometri analizinde hücrelerde belirgin bir değişiklik görülmezken, 100 μM Vitamin C uygulanan HL-60 hücrelerinde apoptotik hücrelerde % 21'lik bir artış görülmüştür. Bunun yanında, 5-50 μM Vitamin C uygulanan hücrelerde NPYR ile indüklenen apoptoziste azalma gözlenmiştir. Bu azalma 30 mM NPYR hücrelere 5 mM Vitamin C uygulaması apoptoziste % 54 azalma meydana getirirken, 50 mM NPYR uygulanan hücrelere 5 mM Vitamin C uygulaması % 59 azalma meydana getirmiştir (1). Vitamin C'nin hücre canlılığına etkisi hücre tipine göre değişmektedir. Vitamin C'nin 0,313 mM ile 3,13 mM konsantrasyonlarında HepG2 hücre canlılığında 2 ve 2.5 kat artış gözlenmiştir.

Apoptozis sürecinde pro-apoptotik sinyal, başlatıcı (initiator) ilk kaspazı aktive etmektedir. Bu da diğer efektör kaspazları aktive etmektedir ve bu sayede hücre bozulma açığa çıkmaktadır. Sinyalleri ayırt edip düzenleyen çeşitli başlatıcı kaspazlar bulunmaktadır. Kaspaz 9, hücre apoptozunu sitotoksik ajanların uyarısı sonucu gerçekleştirmektedir. U.V. ışığı, kimyasallar, DNA bozulmasına yol açan ajanlar ve çeşitli kemoterapötikler apoptozu başlatmaktadır. Burada mitokondriyal hasara bağlı sitokrom c'nin salınımı yoluyla kaspaz 9 aktivasyonunu sağlamaktadır. Hücrede pro-kaspaz olarak bulunan kaspaz 9, otoproses sonucunda olgun kaspaz 9'a dönüşür ve aktif enzim oluşur. Apoptozim ile bağlı kaspaz 9, prokaspaz 3 gibi kaspaz zimojenlerinin aktivasyon sürecini başlatır (15). Devamında sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu meydana gelir (7, 8). Kaspaz 1 apoptotik sürecin temel komponentlerinden biri olmasa bile, birçok sistemde apoptozise sebep olduğu bildirilmiştir. Örneğin, kaspaz 1'in ekspresyonu fibroblastlarda apoptozise sebep olur ve bakteri ile enfekte makrofajların apoptozisi için kaspaz 1 gereklidir (10, 5).

Padayatty ve ark(2006), 1 mM ve üzeri kan Asc-A konsantrasyonunun, intravenöz olarak uygulanmasının kanser tedavisi için gerekli olduğunu ve bu amaçla kullanılacak optimal Asc-A konsantrasyonun ise 5 mM olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda Asc-A ve X-Ray kombinasyonunun HL-60 hücrelerinde apoptozisi arttırdığını gözlemişlerdir (12). Vitamin C (0,313 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM) uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre kaspaz 1 ve kaspaz 3 enzim

aktivitelerinde azalma tespit edilmiştir. Kaspaz 9 enzim aktivitesinde ise 31,3 mM Vitamin C konsantrasyonunda hafif bir artış bulunurken, diğer Vitamin C konsantrasyonlarında azalma görülmüştür. Kaspaz 1 ve 3 enzim aktivitesinde görülen bu azalma, 0,313 mM, 3,13 mM Vitamin C uygulanan hücrelerde kaspaz inhibisyonuna bağlı apoptozisin baskılanmış olabileceğini ve hücre proliferasyonunda artış meydana geldiğini göstermektedir. 31,3 mM Vitamin C uygulanan hücrelerde kaspaz 9 enzim aktivitesi artarken kaspaz 3 aktivitesinin artmaması bu hücrelerde apoptoziste görülen kaspaz kaskadının başlamış olabileceğini ancak henüz tamamlanmamış olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Apoptotik hücre ölümünde mitokondri içinde elektron transport zincirinin bir proteini olan sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımında etkili olmaktadır (14). Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerindeki sitokrom c'nin sitoplazmik ve mitokondriyal düzeylerinin de kontrol hücrelere göre değişiklik göstermemesi, bu hücrelerin apoptotik hücre ölümü meydana gelmemesinden dolayı olabilir. Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde mitokondriyal sitokrom c bantları sitoplazmik sitokrom c bantlarından daha yoğun olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak Vitamin C uygulanan hücrelerde çok düşük dozlarda ve yüksek dozlarda hücre canlılığında azalma görülürken, 0,0313 mM, 0,313 mM ve 3,13 mM konsantrasyonlarda kontrol hücrelere göre belirgin bir şekilde hücre canlılığı artmıştır. Bu değişimler kanser tedavisinde Vitamin C kullanımında uygulanacak dozun önemini göstermektedir.

Kanser tedavisinde antioksidanların verilmesi ve etkilerinin aydınlatılması üzerinde durulması gereken bir konudur. Birçok çalışmada antioksidanların tek başına ya da kemoteropatik ajanlarla kullanımı üzerinde çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Vitamin C'nin farklı dozlarının HepG2 hücrelerinde kemoteropatik ajanlarla birlikte kullanıldığı çalışmaların planlanması ileride yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

5. Ulusal Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi'nde (6-8 Eylül 2011, Aydın, Türkiye) çalışmanın bir kısmı sözlü olarak sunulmuştur. HepG2 Hücrelerinde Selenyum ve Vitamin C'nin Apoptozis Üzerine Etkileri adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

Kaynaklar

1. Arranz N, Haza AI, Garcia A, Delgado ME, Rafter J, Morales P (2008): *Inhibition by vitamin C of apoptosis induced by N-nitrosamines in HepG2 and HL-60 cells*, J. Appl. Toxicol.; **28**, 788-796.
2. Bradford MM. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein*

- utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
3. **Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M** (2005): *Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Actoin As a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissue*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13604-13609.
 4. **Head KA** (1998): *Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer*. *Altern. Med. Rev.* **3**, 174-186.
 5. **Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A** (1999): *The Salmonella invasion SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspas-1*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2396-401.
 6. **Hsieh BS, Huang LW, Su SJ, Cheng HL, Hu YC, Hung TC, Chang KL** (2011). *Combined arginin and ascorbic acid treatment induced apoptosis in the hepatoma cell line HA22T/VGH and changes in redox status involving the pentose phosphate pathway and reactive oxygen and nitrogen species*. *J Nutr Biochem* **22**, 234-41.
 7. **Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G** (1999): *Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis*, *EMBO J.* **18**, 3586-3595.
 8. **Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xia Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC** (1999): *Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia*. *Proc Natl Acad Sci, USA* **96**, 5752-5757.
 9. **Leung PY, Miyashita K, Young M, Tsao CS** (1993): *Cytotoxic effect of ascorbate and its derivatives on cultured malignant and nonmalignant cell lines*. *Anticancer Res* **13**, 475-480.
 10. **Miura M, Zhu H, Rotello R., Hartweig EA, Yuan J** (1993): *Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3*. *Cell* **75**, 653-660.
 11. **Naidu KA, Karl RC, Naidu KA, Coppola D** (2003): *Antiproliferative and proapoptotic effect of ascorbyl stearate in human pancreatic cancer cells: association with decreased expression of insulin-like growth factor 1 receptor* *Digestive Disease And Science* **48**, 230-237.
 12. **Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM** (2006): *Intraavenously administered vitamin C as cancer therapy: Three cases*. *CMAJ*, **174**, 937-942.
 13. **Reynolds JA, Tanford C** (1970): *The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes*. *J. Biol. Chem.*, **245**, 5161-5165.
 14. **Rudolf E, Rudolf K, Cervinka M** (2008): *Selenium activates p53 and p38 pathway and induces caspases-independent cell death in cervical cancer cells*. *Cell Biol Toxicol* **24**:123-141.
 15. **Salvesen GS, Dixit VM** (1997) *Caspases: intracellular signaling by proteolysis*. *Cell*, **91**, 443-446.
 16. **Shinozaki K, Hosokawa Y, Hazawa M, Kashiwakura I, Okumura K, Kaku T, Nakayama E** (2011): *Ascorbic acid enhances radiation-induced apoptosis in an HL60 human leukemia cell line*, *J Radiat Res*, **52**, 229-237.
 17. **Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J** (1990): *Free radicals and antioxidant systems in health and disease*. *Brj Hosp Med* **43**, 334-344.
 18. **Song HJ, Shin SH, Ross GM** (2001): *Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vivo system*. *Brain Res*, **895**, 66-72.
 19. **Stratton MR, Campbell PJ, Futreal A** (2009): *The cancer genome*. *Nature* **458**, 719-724.
 20. **Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V** (2005): *Biyostatistik*. Hatipoğlu yayınları:53, Ankara, 270
- Geliş tarihi: 10.05.2013 / Kabul tarihi: 27.02.2014
- Yazışma Adresi :**
 Yrd. Doç. Dr. Burcu Menekşe Balkan
 Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi,
 Veteriner Fakültesi,
 Biyokimya Anabilim Dalı,
 İstiklal Yerleşkesi, Burdur
 e-mail: burcualpasla@yahoo.com