



***Usnea filipendula* Stirt.'İN KOLON KANSERİ
HÜCRE SOYLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Cyrollah DISOMA



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Usnea filipendula* Stirt.'İN KOLON KANSERİ
HÜCRE SOYLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Cyrollah DISOMA

Doç. Dr. Ferda ARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2016
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Cyrollah Disoma tarafından hazırlanan “*Usnea filipendula* Stirt.’in kolon kanseri hücre soyları üzerine sitotoksik aktivitesinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ferda Arı

Başkan: Doç. Dr. Ferda Arı
Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza:

Üye: Prof. Dr. Engin Ulukaya
Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İmza:

Üye Doç. Dr. Serap Çelikler Kasımoğulları
Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza:

Üye Doç. Dr. Elif İlkay Armutak
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Veteriner Hekimliği Temel Bilimler Bölümü

İmza:

Üye Yrd. Doç. Dr. Egemen Dere
Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza:

Yukardaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
03/06/2016

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada:

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğim,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

03/06/2016

Cyrollah DISOMA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Usnea filipendula Stirt.'İN KOLON KANSERİ HÜCRE SOYLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Cyrollah DISOMA

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ferda ARI

Dünyada ve ülkemizde önemli sağlık sorunlarından biri olan kolorektal kanseri tedavisinde halen tam olarak başarı elde edilememiştir. Bu nedenle yeni tedavi rejimlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda, mantar ve alglerin (veya siyanobakterilerin) simbiyotik ortaklıkları sonucu oluşan likenler, kanser araştırmalarında oldukça ilgi çekmektedir. Bu çalışmada, *Usnea filipendula* Stirt. liken türünün metanol ekstraktının insan kolon kanser hücre soyları (HCT-15 ve HT-29) üzerine sitotoksik etkisi ve mekanizmaları araştırılmıştır. Sitotoksik aktiviteyi belirlemek için SRB ve ATP testleri kullanılmıştır. Sitotoksik etkidenden sorumlu olan hücre ölümü (apoptozis/nekrosiz) belirlenmesi için, kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30) yöntemi ve floresans boyama yöntemleri (Anneksin-V ve Hoechst 33342 ve propidyum iyodür boyama) kullanılmıştır. Ayrıca hücre ölüm kinetiği parametreleri (Kaspaz-3/7 ve Mitokondri Membran Potansiyeli) akım sitometri ile belirlenmiştir. Sonuçta, *Usnea filipendula* metanol ekstraktının HCT-15 ve HT-29 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini engellediği belirlenmiştir. *Usnea filipendula* ekstraktının IC50 değeri HCT-15 ve HT-29 hücrelerinde sırayla 17,20 µg/ml ve 40,94 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ekstraktın her iki hücre soyunda da apoptozisi arttırdığı özellikle HCT-15 hücrelerinde Kaspaz-3/7 artışının gözlenmesi hücrelerin kaspaz bağımlı yolak üzerinden apoptozise gidebileceği belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında *Usnea filipendula* ekstraktının HCT-15 ve HT-29 insan kolon kanser hücre soyları üzerinde apoptozisi (erken ve geç apoptozis) indükleyerek sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, *Usnea filipendula*, kolorektal kanser, kanser hücre ölümü

2016, viii + 68 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

CYTOTOXIC ACTIVITY OF *Usnea filipendula* Stirt. IN COLON CANCER CELL LINES

Cyrollah DISOMA

Uludag University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ferda ARI

As one of the major health problems worldwide and in our country, the treatment for colorectal cancer has not been fully successful. Thus, there is a need for the development of new treatment regimens. Recently, lichens which are complex organisms living in a symbiotic relationship with fungi and algae (or cyanobacteria) received special interest in cancer research. In this study, the cytotoxic activity and its mechanisms of methanol extract of lichen *Usnea filipendula* Stirt. was investigated on colon cancer (HCT-15 and HT-29) cell lines. SRB and ATP cell viability tests were used to monitor cytotoxic activity. In order to determine the mode of cell death (apoptosis/necrosis) responsible for the cytotoxic effect, caspase-cleaved cytokeratin 18 (M30) method and fluorescence staining techniques (Annexin-V, Hoechst 33342, and Propodium iodide) were used. Cell death kinetics parameters (Caspase-3/7 activity and Mitochondria Membrane Potential) were also investigated using flow cytometry. Methanolic extract of *Usnea filipendula* showed dose and time-dependent anti-proliferative effect in HCT-15 and HT-29 cells. The IC₅₀ values of *Usnea filipendula* methanol extract in HCT-15 and HT-29 cells are 17,20 µg/ml and 40,94 µg/ml, respectively. The extract induces caspase-dependent apoptosis in both cell lines especially in HCT-15 cells which increase of Caspase-3/7 activity was observed. As a conclusion, this reseach has shown that methanol extract of *Usnea filipendula* is cytotoxic in colon cancer HCT-15 and HT-29 cell lines by inducing apoptosis (early or late apoptosis).

Keywords: Apoptosis, *Usnea filipendula*, colorectal cancer, cancer cell death
2016, viii + 68 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarında danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ferda ARI'ya,

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında sonsuz anlayış ve desteğiyle hep yanımda olan, benim için çok değerli olan bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol gösteren, ilgi ve yardımlarını benden hiç eksik etmeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Çalışmalarım süresince bana her konuda yardımcı olan, sorularımı asla yanıtsız bırakmayan hocalarım, Sayın Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL ve Sayın Doç. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI'na,

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan Merve ERKISA'ya,

Tez çalışmam boyunca Türkçe'ye çevrediklerime yardımcı olan Buse CEVATEMRE, Şeyma AYDINLIK, Oğuzhan AKGÜN, Dilara KARAMAN, Emre ÇELİK ve İsa ATALAY'a

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan Didem KARAKAŞ, Pınar ALPER, Nazlihan AZTOPAL, Selin ÖRCÜN, Mehmet SARIMMAHMUT'a

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi aile fertlerime sonsuz teşekkür bir borç bilirim.

Cyrollah DISOMA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	i
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
GİRİŞ.....	1
1. KAYNAK ÖZETLER.....	3
1.1.Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	3
1.2.Apoptozis.....	7
1.2.1.Apoptozis Mekanizmaları.....	10
1.3.Kolorektal Kanser.....	13
1.3.1. Risk Faktörleri.....	14
1.4.Likenler.....	15
1.4.1.Likenlerin Biyolojik Etkinlikleri.....	16
1.4.2. <i>Usnea</i> Cinsinin Taksonomisi ve Morfolojik Özellikler.....	18
1.4.3.Usnik Asit.....	19
1.4.4. <i>Usnea filipendula</i> Stirt.....	21
2.MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
2.1.Materyal.....	24
2.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	24
2.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	25
2.2.Yöntem.....	25
2.2.1. <i>Usnea filipendula</i> Liken Türünün Toplanması ve Tayini.....	25
2.2.2. <i>Usnea filipendula</i> Liken Türünün Ekstraksiyonu ve Liyofilizasyonu.....	25
2.2.3. <i>Usnea filipendula</i> Ekstraktının Hazırlanması.....	26
2.2.4.Hücre Kültürü.....	26
2.2.4.1.Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması.....	27
2.2.4.2.Hücre Soylarının Pasajlanması.....	27
2.2.4.3.Hücre Soylarının Stoklanması.....	27
2.2.4.4.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	28
2.2.4.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	28
2.2.5.SRB (Sulforhodamine B) Canlılık Metodu.....	28
2.2.6.ATP Canlılık Metodu.....	30
2.2.7.Kaspazla Kırılmış Sitokeratin-18 (M30) Metodu.....	31
2.2.8.Floresans Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi.....	32
2.2.8.1.Hoeschst 33342 Boyama Metodu.....	32
2.2.8.2.Annexin-V ve Propidium İyodür Boyama Metodu.....	33
2.2.9.Akım Sitometri ile Hücre Ölüm Kinetiği Parametrelerinin Belirlenmesi.....	34
2.2.9.1.Kazpaz-3/7 Aktivitesi Analizi.....	34
2.2.9.2.Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi.....	36
2.2.10.İstatistiksel Analiz.....	37

3.BULGULAR.....	38
3.1.SRB Canlılık Testi Bulguları.....	38
3.2.ATP Canlılık Testi Bulguları.....	39
3.3.Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18 (M30) Metodu Bulguları.....	40
3.4.Floresan Mikroskobu ile Yapılan Değerlendirmeler.....	41
3.4.1.Hoechst 33342 Boyama Bulguları	41
3.4.2.Anneksin-V ve Propidyum İyodür Boyama Bulguları	42
3.5.Kaspaz-3/7 Aktivitesi Bulguları.....	47
3.6.Mitokondri Mebran Potansiyeli Testi Bulguları.....	48
4.SONUÇ VE TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	68



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive eden Faktör (Apoptotic Protease Activating Factor-1)
ATP	: Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate)
CARD	: Kaspaz Takviye Alanı (Caspase Activation and Recruitment Domain)
CK	: Sitokeratin (Cytokeratin)
CTL	: Sitotoksik T lenfosit (Cytotoxic T lymphocyte)
DD	: Ölüm alanı (Death Domain)
DED	: Ölüm Etkileyici Alanı (Death Effector Domain)
DICS	: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleks (Death-inducing signaling complex)
DMSO	: Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
dsDNA	: Çift iplikli Deoksi ribonükleik asit (double stranded Deoxyribonucleic acid)
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik asit (Ethylenediaminetetraacetic acid)
FADD	: Fas İlişkili Ölüm Alanı (Fas-associated Death Domain)
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
FITC	: Floresein izotiyosiyanat (Fluorescein isothiocyanate)
GGK	: Gaitada Gizli Kan (Fecal Occult Blood)
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research into Cancer)
KRK	: Kolorektal Kanser (Colorectal Cancer)
PBS	: Fosfat tuz tampon (Phosphate buffered salt)
Pİ	: Propidyum iyodür (Propidium iodide)
PS	: Fosfotidil serin (Phosphatidyl serine)
RPMİ	: Rosewell Park Memorial İnstitute Medium
SRB	: Sulforhodamine B
TCA	: Trikloroasetik asit (Trichloroacetic acid)
TNF-R	: Tümör nekrozis faktör reseptörü (Tumor necrosis factor receptor)
TRADD	: TNF-R İlişkili Ölüm Bölgesi (TNF-R-associated Death Domain)
UFE	: <i>Usnea filipendula</i> Ekstrakt
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
1.1.Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	3
1.2.Kanser Hücrelerinin Yeni ve Karakteristik Özellikleri.....	6
1.3.Apoptoz ve nekrozda yapısal değişimler.....	9
1.4.Ekstrinsik Apoptozis.....	11
1.5.Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması.....	12
1.6.Dünya’da kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları.....	13
1.7.Liken Maddelerinin Kimyasal Yapıları.....	17
1.8.(-) ve (+)-usnik asidin kimyasal yapıları.....	21
1.9. <i>Usnea filipendula</i> Stirt. türünün morfolojik görüntüsü	22
2.1.Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu.....	34
2.2.Kaspaz-3/7 Aktivitesi Analiz Basamakları.....	35
3.2.Mitokondri Membran Potansiyeli Analiz Basamakları.....	37
3.1.UFE uygulanan HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının canlılık grafiği.....	38
3.2.UFE uygulanan HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının 72 saat sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği.....	39
3.3. M30 standart eğri grafiği.	40
3.4.100 µg/ml, 50 µg/ml, ve 25 µg/ml UFE uygulamasından 72 saat sonra HCT-15 ve HT-29 hücre soylarında M30 seviyeleri	40
3.5.Hoechst 33342 boyama ile HCT-15 hücrelerinin 72 saatlik muamele sonrasındaki floresans mikroskop görüntüleri.	41
3.6.Hoechst 33342 boyama (mavi) ile HT-29 hücrelerinin 72 saatlik muamele sonrasındaki floresans mikroskop görüntüleri.	41
3.7.HCT-15 hücrelerinin 12 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. A: Anneksin-V ile boyama, B: Propidyum iyodür ile.....	43
3.8.HCT-15 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. A: Anneksin-V ile boyama, B: Propidyum iyodür ile.....	44
3.9.HT-29 hücrelerinin 12 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri.A: Anneksin-V ile boyama, B: Propidyum iyodür ile.....	45
3.10.HT-29 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. A: Anneksin-V ile boyama, B: Propidyum iyodür ile.....	46
3.11.UFE uygulanan (100, 50 ve 25 µg/ml) HCT-15 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz).....	47
3.12.UFE uygulanan (100, 50 ve 25 µg/ml) HT-29 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz).....	48
3.13.UFE uygulanan (100, 50 ve 25 µg/ml) HCT-15 hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4=Canlı).....	49
3.14.UFE uygulanan (100, 50 ve 25 µg/ml) HT-29 hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4=Canlı).....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
1.1.Usnea türüleri ve bazı biyolojik aktiviteleri.....	20
3.1.SRB canlılık testi sonuçlarına göre IC50 ve IC90 değerleri.....	38
3.2.ATP canlılık testi sonuçlarına göre IC50 ve IC90 değerleri.....	39



GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması sonucu oluşan dünyada en önemli ölüm sebeplerinden biri olan halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın son yıllardaki araştırmalar verilerine göre dünyada 14 milyon insana kanser teşhisi konmuştur (Ferlay ve ark. 2012). Kolorektal kanser (KRK) dünyada en yaygın görülen kanserlerden biri olup kanserle ilişkili ölümlerde ikinci sırasında yer almaktadır (Siegel ve ark. 2013). Kanser tedavisinde yer alan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarındaki ilerlemelere rağmen kansere bağlı ölüm oranı hala yüksek seviyededir. KRK hastalarında tümör nüksü ve yayılımı sonucu ise bu oran %40'ın üzerine çıkmaktadır (Punt ve Tol 2009). Bu nedenle, hedefe yönelik tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır.

İlaç keşfi yolunda, kemoterapötik ajan adayları olarak doğal bileşiklerin önemi giderek artmaktadır (Lee 1999, Schwartzmann 2000). Doğal bileşikler, biyolojik aktiviteye sahip çok çeşitli kimyasal yapı ve yeni ilaçların geliştirilmesi için önemli prototipler sağlamaktadır (Cragg 1998, Verpoorte 1998, Vuorelaa ve ark. 2004). Günümüzde kullanılan bazı antikanser ilaçlar (vinkristin, vinblastin, etoposid, paklitaksel, kamptotesin, topotekan, irinotekan gibi) bitkilerden elde edilmiştir. Bu ilaçlar sitotoksik etkiye sahip olup farklı mekanizmalarla hücre çoğalmasını engellemektedirler. Kullanılan antikanser ajanların %60'ı doğal kaynaklardan elde edilmiştir. Biyoaktif bileşikler yaprak, meyve, gövde, bitki özü ve kök gibi bitkilerin çeşitli bölümlerinden elde edilmektedir (Bhanot ve Sharma 2011). 2008 yılının başından itibaren çeşitli araştırmalar sonucu prelinik, faz I ve faz III klinik deneysel aşamalarından geçerek Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onay aşamasına gelen 225 doğal ürün temelli antikanser ilaç bulunmaktadır. Bunlardan 108 tanesi bitkilerden, 61 tanesi yarı sentetiklerden, 25 tanesi bakterilerden, 24 tanesi hayvanlardan ve 7 tanesi mantarlardan üretilmiştir. Bilinen 18.000 doğal deniz ürününden 22 tanesi veya bunların kimyasal türevleri ise klinik değerlendirme aşamasındadır. Bu ilerlemelere rağmen, halen özgün antikanser ajanların arayışı devam etmektedir (Burger ve ark. 2014).

Son zamanlarda mantar ve alglerin (veya siyanobakterilerin) simbiyotik ortaklıkları sonucunda oluşan likenler, kanser araştırmalarında ilgi çekmektedir. Likenlerin antibakteriyel, antitümör, antioksidan, anti-viral, anti-enflamatuar, sitotoksik, analjezik, antipiretik ve antiproliferatif özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir (Molnar ve Farkas

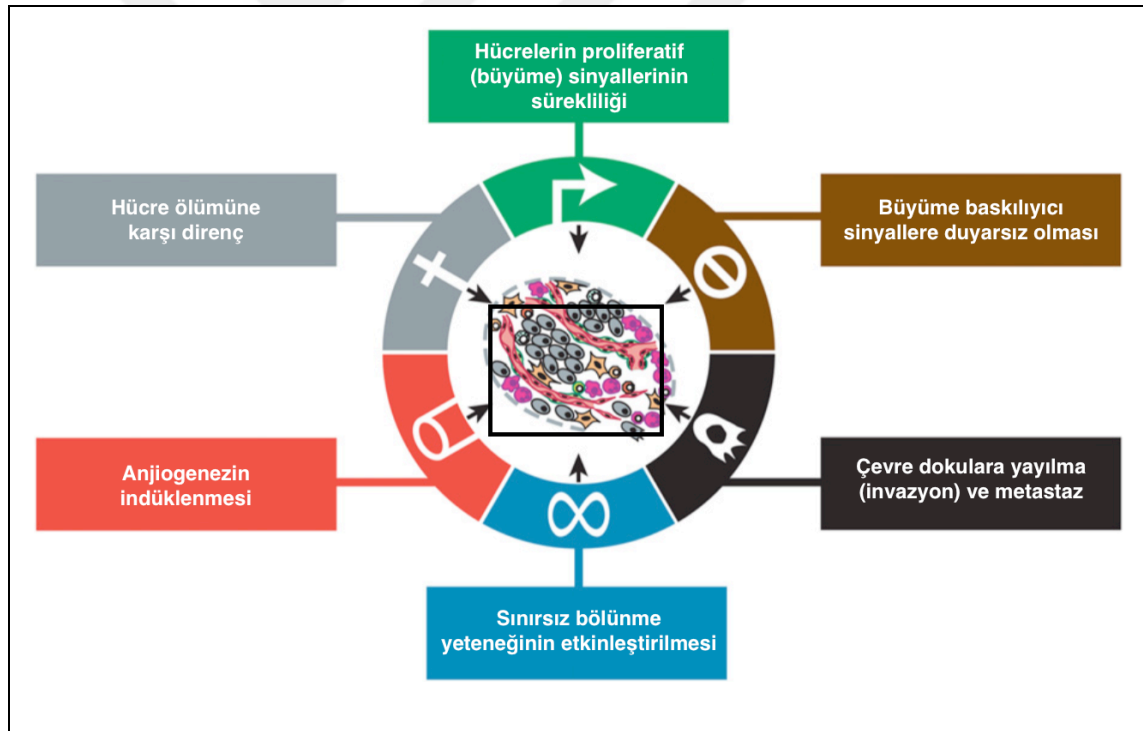
2010, Mitrovic ve ark. 2011a). Parmeliaceae, *Lecanorales* takımının en büyük ve kalabalık ailesidir. Parmeliaceae ailesi 87 cinse sahip olup, 2000'den fazla tür barındırmaktadır. En önemli cinslerden biri olan *Usnea* 500'den fazla türe sahiptir. Bu cins farklı iklim bölgelerinde ve habitatlarda geniş bir yelpazede bulunmakta ve kozmopolit bir dağılıma sahip olmaktadır (Kantheti ve ark. 2012). Bu tez çalışmasında, *Usnea filipendula* Stirt. bitkisinden elde edilen metanol ekstraktının kolon kanseri hücre soyları (HCT-15 ve HT-29) üzerindeki sitotoksik/apoptotik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



1.KAYNAK ÖZETLERİ

1.1.Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücrelerinde 2000 yılında, hücrelerin proliferatif (büyüme) sinyallerinin sürekliliği, büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsız olması, çevre dokulara yayılma (invazyon) ve metastaz (farklı dokulara yayılma) aktivasyonu, sınırsız bölünme yeteneğinin etkinleştirilmesi, angiogenezin (yeni kan damarlarının yapımı) indüklenmesi ve hücre ölümüne karşı direnç gibi fenotipik özellikleri belirlendi (Şekil 1.1) (Hanahan ve Weinberg 2000). Kanser oluşum sürecindeki hücrelerde görülen fenotipik değişiklikler genetik değişimlerin sonucu olarak nitelendirilmektedir. Normal hücrenin kanser hücresine değişim süreci hızlı değildir. Baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA tamirinde rol oynayan kritik genlerdeki mutasyonlar genetik değişkenlik ve farklılaşmaya neden olmaktadır. Bu edinilen fonksiyonel yetenekler kanser hücrelerinin hayatta kalmasına, çoğalmasına ve yayılmasına olanak sağlar.



Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2000).

Normal hücreler, bölünme aşamasında G_0 (durgun faz) fazından aktif proliferatif faza ilerlemeden önce mitotik büyüme sinyallerine ihtiyaç duyar. Bu gereksinim büyüme sinyallerinin özerkliği olarak adlandırılır. Kanser hücreleri ise proliferatif faza ilerlemek için büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaz. Kanser hücrelerinde büyüme sinyalleri

özerkliğini nasıl kazanacağını açıklamaya yönelik üç moleküler stratejisi önerilmiştir. Bunlar;

-hücre dışından gelen büyüme sinyallerinde değişiklikler

-bu sinyallerin transellüler iletimi ya da

-intraseellüler yollar üzerinden bu sinyalleri eyleme dönüştürülmesidir (Fedi ve ark. 1997).

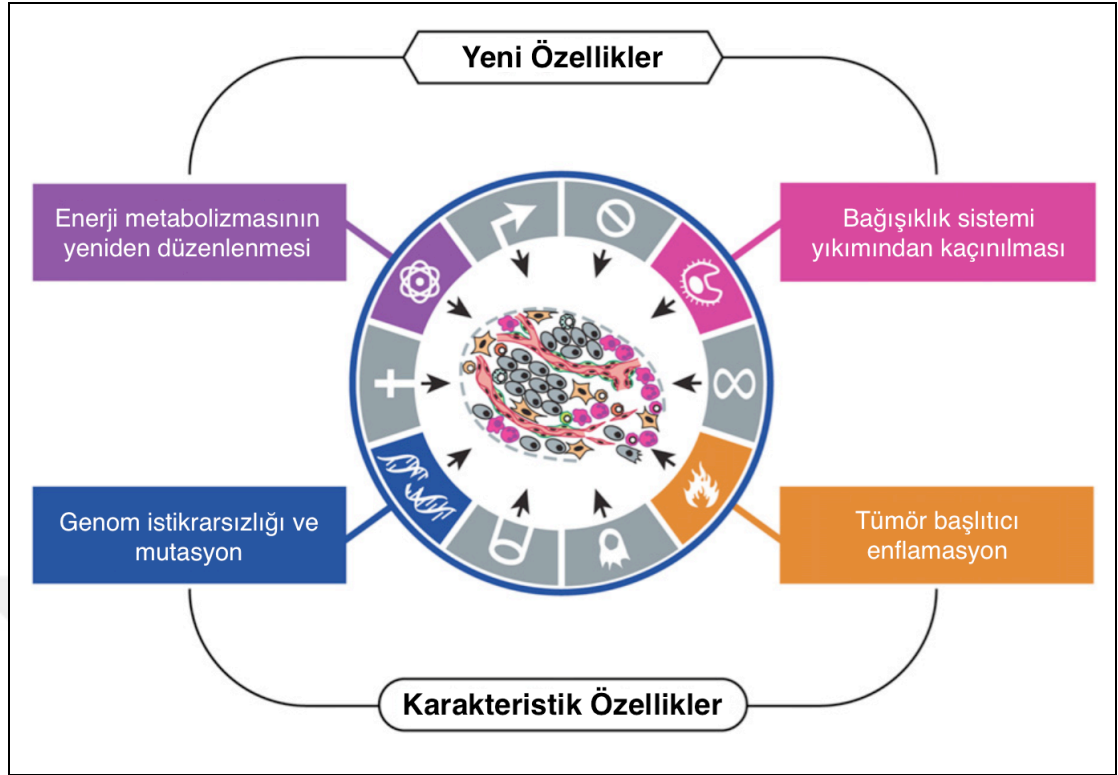
Kanser hücrelerinin sahip olduğu diğer özellik büyüme baskılayıcı sinyallere karşı duyarsız olmalarıdır. Normal hücreler, hücresel sessizliği sürdürmek ve doku homeostazı (dengesi) için hücre dışı ortamda (ekstrasellüler matriks) veya civarındaki hücrelerin yüzeyinde bulunan çeşitli antiproliferatif sinyallere sahiptir. Kanser hücrelerinin transkripsiyon faktörleri (E2F gibi) serbest bırakarak hücre proliferasyonunu uyaran tümör baskılayıcı proteinleri (retinoblastoma protein gibi) bozarak antiproliferatif sinyallerden kaçındığı düşünülmektedir. Buna ek olarak, kanser hücreleri ayrıca integrinleri ve büyüme-karşıtı sinyaller gönderen diğer hücre-yapışma (adezyon) moleküllerinin ifadesini (ekspresyonunu) de inhibe edebilirler (Lukashev ve Werb 1998, Giaccotti ve Ruoslahti 1999).

Normal hücreler sınırlı replikatif potansiyele sahiptir ve hücreler belirli sayıda (60 ile 70) bölündükten sonra büyümesi durmaktadır. Bu sürece yaşlanma (senesens) denir. Ancak nadir bir varyant hücre (10^7 hücrede 1 hücre) limitsiz çoğalabilme yeteneği elde edebilir ve bu özellik ölümsüzleşme olarak adlandırılır. Bu özellik tümör ilerlemesi aşamasında görülür ve habis (malignant) büyüme durumunun gelişmesi için önemlidir. Kanser hücreleri böyle bir durumda telomerez enziminin ekspresyonunu artırarak telomeri devam ettirme yeteneği kazanması gerekmektedir (Bryan ve Cech 1999, Blackburn 2005).

Kanser hücrelerinin sahip olduğu bir diğer yetenek anjiogenezin sürdürülmesidir. Hücre fonksiyonu ve sağ kalımı damarlar aracılığıyla devamlı olarak oksijen ve besin maddeleri alımı üzerinden sürdürülmektedir. Organ oluşumu (organogenez) sürecinde yeni kan damarlarının büyümesi yani anjiogenez süreci oldukça dikkatli düzenlenir. Kanser hücreleri, hücre sayısındaki artışı desteklemek için oksijen ve diğer besin maddelerine ihtiyaç duyar ve bunu sağlamak için kan damarlarının büyümesini teşvik eder (Hicklin ve Ellis 2005, Veikkola ve Alitalo 1999).

Primer tümörler tümör bölgesinden farklı yerlere hareket ederek yeni koloniler oluşturabilen ve çevre dokulara yayılabilen öncü hücrelerin ortaya çıkmasını sağlar. Böylece farklı dokulara yayılabilen yani metastaz yapabilme kapasitesine sahip olmaktadır. Kanser hücreleri vücutta özellikle besin ve yer bakımından zengin bölgeleri tercih ederek koloni oluştururlar. Metastazda, hücreleri ekstrasellüler matrikse bağlayan hücre-hücre yapışma molekülleri ve integrinler önemli rol oynamaktadır (Aplin ve ark. 1998, Bendas and Borsig 2012). Epitelyal hücrelerde ifade edilen hücre-hücre etkileşimi sağlayan molekül olan E-kaderin önemli proteinlerden birisidir. Metastatik kanserler özellikle epitelyal kanserlerde E-kaderin fonksiyonunun kaybedildiği gösterilmiştir. Proteazlar da, proteaz genlerin arttırarak düzenlenmesi (up-regülasyon) ve proteaz inhibitör genlerin azaltılarak düzenlenmesi (down-regülasyonu) aracılığıyla kanser hücrelerinin yeni dokulara yayılması ve metastazına katkı sağlar (Christofori ve Semb 1999, Jeanes ve ark. 2008).

2011 yılında Hanahan ve Weinberg, enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi ve bağışıklık sistemi yıkımından kaçınılması şeklinde kanserli hücrelerinin özelliklerine iki yeni özellik daha eklemiştir (Şekil 1.2) (Hanahan ve Weinberg 2011). Bunlara ilave olarak genom kararsızlığı/mutasyon ve tümör başlatıcı enflamasyon olmak üzere iki karakteristik özellik daha tanımlanmıştır. Kanser genel olarak genetik bir hastalık olarak düşünülmektedir. Kanser hücreleri, kromozomların yeniden düzenlemesine neden olan rasgele mutasyonlar oluştururlar. Tümör ilişkili enflamatuvar yanıt, büyüme faktörleri, hücre ölümü sınırlayan yaşam faktörleri, proanjiogenik faktörler, hücre dışı matriks düzenleyen enzimler gibi bioaktif molekülerin tümör mikroçevreye katkı sağlayarak da tümör oluşumunu ve ilerlemesini artırır.



Şekil 1.2. Kanser hücrelerinin yeni ve karakteristik özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011).

Son zamanlarda ise kanserin bir metabolik hastalık olduğu düşünülmektedir. Bu durum kontrolsüz hücre çoğalmasına ve hücre büyümesine katkı sağlayan enerji metabolizmasındaki değişikliğin bir sonucudur. Normal hücrelerin glikoliz ve mitokondrial oksidatif fosforilasyon yoluyla glukoz kullanılmasının aksine, kanser hücreleri enerji üretmek için glikoliz yolunu daha çok kullanmaktadırlar (Zheng 2012). Almanyalı Otto Warburg 1930'lu yıllarda kanser hücrelerinin enerji metabolizmalarındaki bu anormal özelliği incelemiştir. Glikoliz ile ATP üretiminin 18 katlık düşük verimliliğini telafi etmek için kanser hücreleri sitoplazmaya oldukça fazla glukoz göndererek glukoz taşıyıcılarının ekspresyonlarını arttırmaktadırlar (Jones ve Thompson 2009, DeBerardinis ve ark. 2008, Hsu ve Sabatini 2008).

Bağışıklık hücrelerinden kaçma, gelişmekte olan kanser hücrelerinin başka bir özelliğidir. Bağışıklık sisteminin geç evre tümör ve mikrometaz aşamasında engellemesinin bunda bir rolü olup olmadığı tartışmalıdır. Bağışıklık sistemi kanser hücreleri ve tümörlerin çoğunluğunu fark edip yok etmektedir. Ancak son yıllarda yapılan *in vivo* çalışmalar ve epidemiolojinin kanıtlarına göre bağışıklık sistemi, tümör oluşumu ve gelişiminin engellenmesinde rol oynamaktadır (Teng ve ark. 2008, Bindea

ve ark. 2010). Kanserin bazı formlarında ise anti-tümör bağışıklık tepkisi olduğu bildirilmiştir (Ferrone ve Dranoff 2010, Nelson 2008). Mesela kolon kanserli CD8⁺ sitotoksik T lenfosit (CTL) ve doğal katil hücreler bakımından kan değerleri yüksek olan hastaların prognozu, lenfosit değerleri düşük olan hastaların prognozu ile karşılaştırıldığında, daha iyi olduğu görülmüştür (Pages ve ark. 2010, Nelson 2008).

Dünya Sağlık Örgütüne göre her yıl tahmin edilen 8,2 milyon kanser nedenli ölümler ve beklenen %70'lik artışı göz önüne alındığında; kanserin biyolojisini anlamamız tedavi için çok değerli yaklaşımlara ışık tutacaktır. Kanserin her köşetaş özelliğini anlamak hastanın prognuzuna katkı sağlayan hedef ilaçlarının gelişmesini de sağlayacaktır. Kanser, gelişimlere rağmen şu an dünyadaki ölümlerin %13'nün nedenini oluşturmaktadır (Anonim 2016a). Bundan dolayı, kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki anormallikleri araştırmaya çalışan temel çalışmalar, kanser araştırmalarında öncelik teşkil etmektedir.

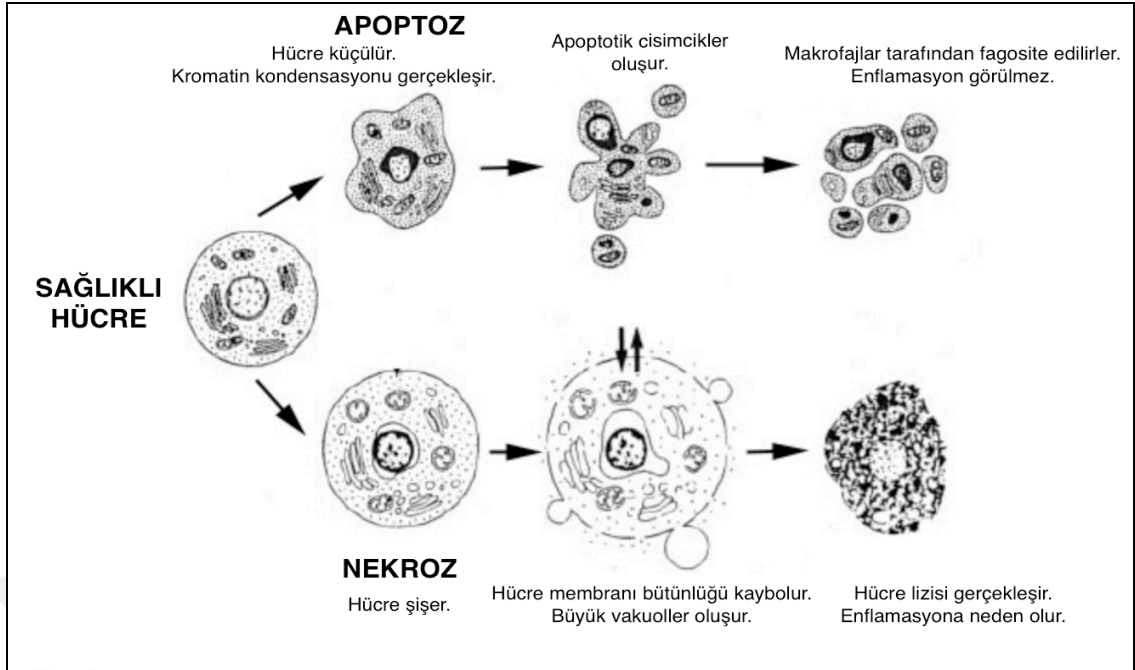
1.2.Apoptozis

Hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere başlıca iki alternatif ve farklı mekanizma ile oluşmaktadır (Kerr ve ark. 1972). Canlı organizmanın homeostazı sürdürebilmesi açısından apoptoz en önemli düzenleyici fonksiyonlardan biridir. Apoptozun öncelikli bir fizyolojik hücre ölüm biçimi olduğu düşünülmesine rağmen yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde hedef olarak kullanılan bir yoldur (Russo ve ark. 2006). Bazı hastalıklarda apoptoz fonksiyonel olarak hasarlıdır. Örneğin nörodejeneratif hastalıklarda (alzheimer, huntington ve parkinson sendromları, edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu, skleroz ve miyokardiyal enfarktüs gibi) apoptoz oranı patolojik bir şekilde artarken, otoimmün lenfoproliferatif sendromu ve kanserde azaldığı görülmüştür (Kerr ve ark. 1994, Ethell ve Buhler 2003, Hochhauser ve ark. 2003, Worth ve ark. 2006).

Nekroz; iltihap, iskemi veya toksik yaralanma gibi dışsal toksik faktörlere yanıt olarak oluşan pasif, katabolik, ve patolojik bir hücre ölümüdür (Kanduc ve ark. 2002). Normal fizyolojik koşullar altında meydana gelmez ve mitokondrinin şişmesi, erken hücre zarı parçalanması, kromatin dağılımı ve hücre iskeleti yıkılması ile karakterize edilmektedir. Diğer yandan apoptoz aktif, metabolik, genetik olarak kodlanmış ve evrimsel olarak korunmuş bir ölüm yoludur (Hengartner 2000). Apoptoz gelişimin herhangi bir aşamasında istenmeyen hücreleri ortadan kaldırarak hücrenin ölümüne yol açan karışık

biyolojik bir süreçtir (Meier ve ark. 2000). Bundan dolayı bu süreç normal homeostazın sürdürülmesi ve habis (malign) hücrelerin yok edilmesi için önemlidir (Leist ve Jaatella 2001).

Apoptozisin erken evrelerinde hücrelerin küçülmesi, çekirdek büzülmesi ve kromatinin nüklear membran civarında toplanması/yoğunlaşması gözlemlenmektedir. Apoptotik hücre membranı intakt olup üzerinde küçük cepcikler “membran blebleri” oluşur. Daha sonraki evrede çekirdek yoğunlaşıp kromozomal DNA’nın nükleozomal birimlerine parçalanması gözlenmektedir. Kromatin kondansasyonu, nükleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması ile karakterizedir. Kromatinde 180-200 baz çiftinden oluşan parçalar, elektroforezde ip merdiven (ladder pattern) görüntüsü oluştururlar. İnternükleozomal DNA parçalanmasının kalsiyum artışına duyarlı endonükleazlar ile olduğu ileri sürülmektedir. Hücre büzülmeye ve küçülmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği küçük parçalara ayrılır. İçerisinde sitoplazma ve organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da bulunan bu parçacıklara apoptotik cisimcikler denir (Şekil 1.3). İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu iç ve dış plazma membran arasında fosfotidil serinin (PS) dış yüzey tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Yüzeydeki PS floresan izotiyosiyanat (FITC) işaretli anneksin V kullanılan akım sitometri ile belirlenebilir. Apoptotik cisimcikler sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edirlirler. Apoptotik cisimcikler fagosit edilmez ise sekonder nekroz olarak adlandırılan bir süreç içerisine girerek degrade olurlar (Saraste ve Pulkki 2000).



Şekil 1.3. Apoptoz ve nekrozda oluşan yapısal değişimler (Van Cruchten ve Van Den Broeck 2002).

Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişiklikleri sistein proteazlar tarafından oluşturur. Bu proteazlar birbirinin homologudur ve kaspaz olarak bilinen büyük bir protein ailesinin üyesidir (Hengartner 2000). Kaspazlar (cysteinyll aspartate-specific proteinases) son derece korunmuş olup başta insanlar ve hayvanlar olmak üzere böcek nematod ve hidra gibi alt formlarında da bulunur (Koonin ve Aravind 2002). İnsanlarda 11'dan fazla kaspaz belirlenmiş olup bu sayısının üçte ikisinin apoptozisde rol aldığı bilinmektedir (Li ve Yuan 2008). Kaspazlar aktif merkezinde sistein amino asiti olan pro-enzim olarak sentez edilirler (Degterev ve ark. 2003). Pro-apoptotik kaspazların iki grubu vardır: Bunların ilk grubu başlatıcı kaspazları oluşturmakta (prokaspaz-2, -8, -9, ve -10) diğer grubu ise efektör kaspazları (prokaspaz-3, -6, ve -7) oluşturmaktadır (Thornberry ve Lazebnik 1998).

Apoptoz hücre yüzey resöptörlerinin ligasyonu, DNA tamir mekanizmaları bozukluklarına bağlı olarak oluşan DNA hasarı, ışın tedavisi ve sitotoksik ilaçların tedavisi, sağkalım sinyallerinin olmaması, ve gelişimsel ölüm sinyaller gibi çeşitli uyaranlar tarafından tetiklenebilmektedir (Gewies 2003).

Apoptozis; homeostaz, embriyonik gelişim ve doku rejenerasyonunda ayrıca kanserde de önemli bir rol oynamaktadır (Luo ve ark. 2012). Apoptozu başlatmak ya da engellemek için sitokinler, sitotoksik ilaçlar, hormonlar, oksidatif stres, sitokrom c ve

endoplasmik retetikulum (ER) stres gibi çeşitli uyarıcılar kullanılmaktadır. Küçük bir protein (5-10 kDa) olan sitokinler hücre proliferasyonu ve apoptozis indüklemesinde baskın olarak supresör bir rol oynamaktadır (Lebman ve Edmiston 1999). Sitotoksik ilaçlar enzimlerin aktivasyonunu, protein ekspresyonlarını ya da hücre döngüsü gibi farklı mekanizmalarla apoptozisi indükleyerek hücre ölümünü uyarabilmektedirler. Hormonlar da apoptozisi regüle edebilmektedirler. Örneğin leptin, kırılmış kaspaz-3 ve Bcl-2 proteini azaltarak apoptozisi inhibe edebilmektedir (Wendrenmaire ve ark. 2011). Glukokortikoidler, progesteron, tiroid hormonları ve estrogen gibi farklı hormonlar farklı kanser hücrelerinde apoptozisi indükleyici rol oynamaktadır (Hongmei 2012). Proapoptotik bir protein olan sitokrom c, Bak/Bax dengesinin değiştirerek apoptozisi indükleyebilmektedir (Kanno ve ark. 2002). Hipoksi, kalsiyum dengesinin bozukluğu, oksidatif stres, besin yoksunluğu, metabolik değişiklikleri gibi stresli kondüsyonlarda ER uyarımlı stress apoptozisi tetiklenir. ER stres kanserin gelişi kanserin gelişimiyle ilişkilidir (Logue ve ark. 2013).

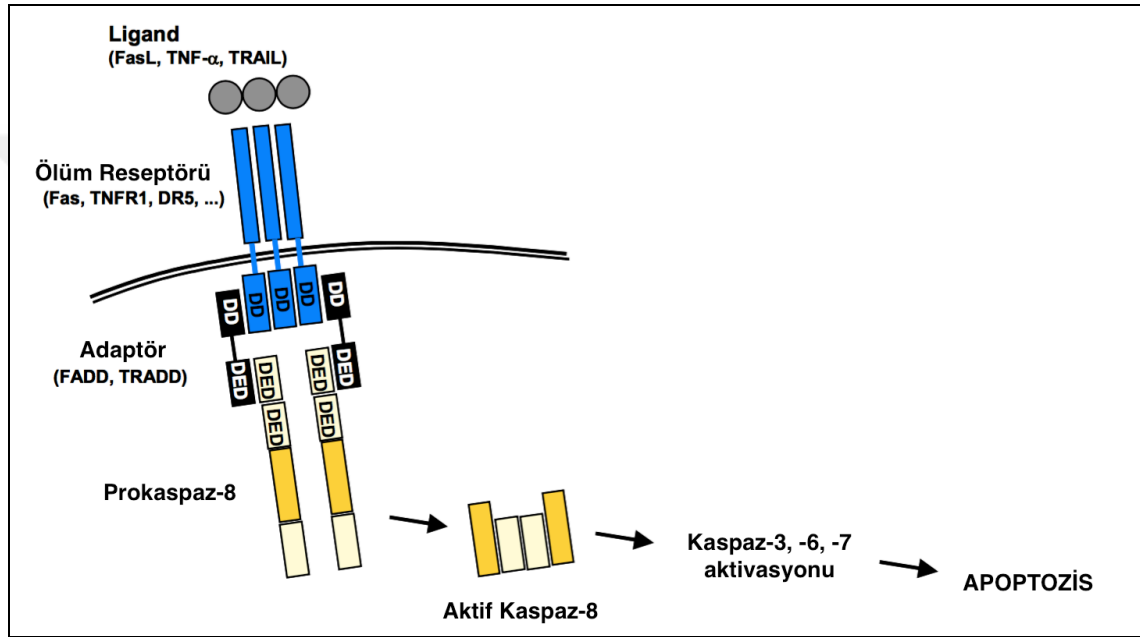
1.2.1.Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis indüklenmesinde iki temel sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir: ekstrinsik/ölüm reseptörü yolak ve intrinsik/mitokondri yolak. Bu iki yol birbirinden görünüşte ayrıdır ancak son aşamasında tek bir önemli noktada birleşir (Earnshaw ve ark. 1999).

Ekstrinsik Apoptosis

Apoptozisin ekstrinsik yoluyla indüklenmesi, plazma membranındaki ekstraselüler ligandlar ve ölüm reseptörlerin aktivasyonu ile başlar (Şekil 1.4). Fas (Apo-1 or CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü (TNF-R) tipik ölüm reseptörleridir. Sitozolik ölüm alanı (death domain; DD) içeren iki reseptör de TNF-R ailesine aittir. TNFR ailesinin tüm üyeleri spesifik bir şekilde liganları tanıyan ve ölüm reseptörleri ile aktifleşecek sistein-zengin ekstraselüler subdomains bölgelerine sahiptirler. Apoptozu gerçekleştiren enzimler sistein aspartik asit proteazlardır. Ölüm bölgesi olarak adlandırılan korunmuş DNA dizisi içeren bölge sinyalizasyon ölüm reseptörünün sitoplazmik parçasını oluşturmaktadır. Reseptör-kaynaklı yolu, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksine (Death inducing signaling complex; DICS) başlatıcı kazparların (kaspaz-8 ve 10) alımı yol açar. DISC, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) içerir. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirmektedir.

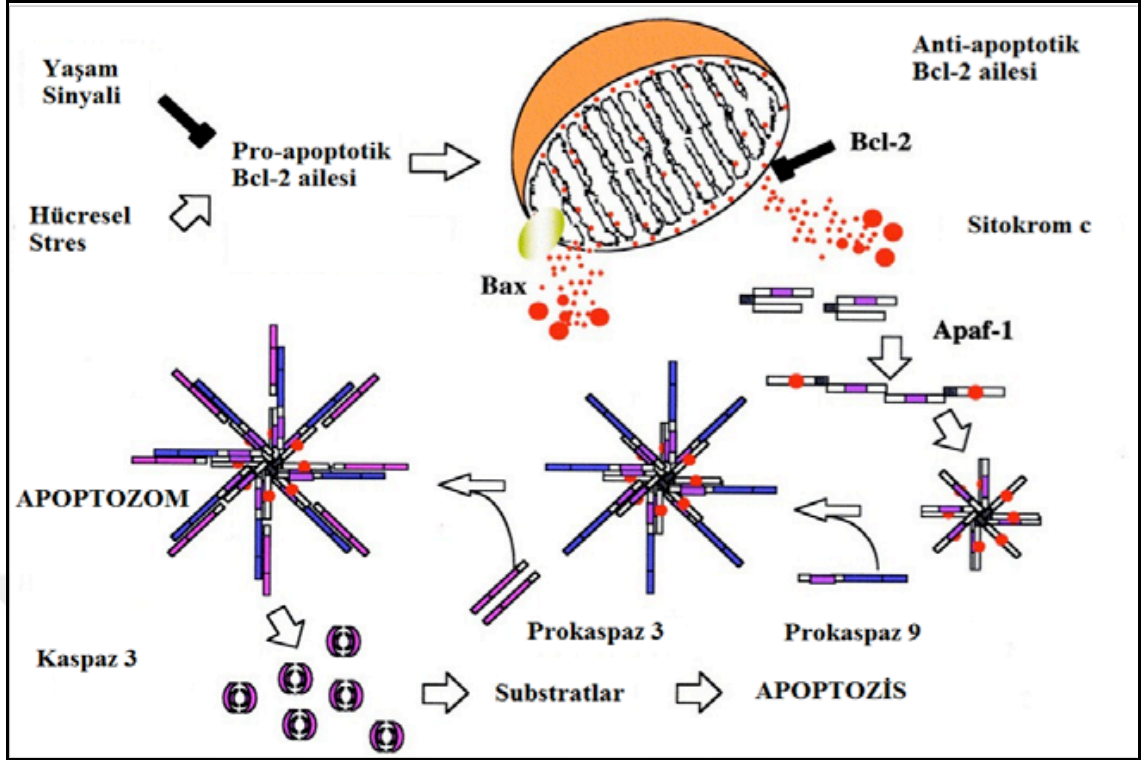
Aktifleşmiş kaspazlar hemen efektör kaspazları (3, 6, 7) aktifleştirir. Şekil 1.4’de gösterildiği gibi başlatıcı kaspazlar, protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir ‘prodomain’ içerir. Bu motifler, ya ölüm etkileyici alanı (DED; death effector domain) ya da kaspaz takviye alanıdır (CARD; caspase recruitment domain). Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini sağlarlar (Lamkanfi 2011). DICS aslında Fas, FasL, FADD, ve pro-kaspaz-8 içeren bir komplekstir. Prokaspaz-8 moleküller DISC yakınına getirilir, aktif kaspaz-8 hemen kaspaz-3 veya diğer kaspazları ayırır, sonuçta apoptozis oluşur (Lawen 2008).



Şekil 1.4. Ekstrinsik apoptozis yolu (Sartorius ve ark. 2001).

İntrinsik Apoptozis

Mitokondriyal yolu DNA hasarı, oksidatif stres, açlık ve sitotoksik ilaç tedavisi gibi ekstrasellüler ve intraselüler stresler aktif hale getirir. Apoptozisi başlatan şartların çoğunlukla mitokondri iç membran potansiyelinin bozukluğuna ve geçirgenliğinin ani artmasına neden olmaktadır. Apoptotik sinyaller, sitoplazmadaki apoptotik proteaz aktifleştiren faktörü-1’e (Apoptotic Protease Activating Factor-1, Apaf-1) bağlanan ve mitokondri zarları arasından gelen sitokrom c içeren moleküllerin serbest bırakılmasına yol açar (Şekil 1.5). Sitokrom c’nin serbest bırakılması, mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına ve mitokondri geçirgenliğine neden olmaktadır. Sitokrom c’nin Apaf-1’e bağlanması, kaspazların aktivasyonu ile apoptozom oluşumu meydana gelir (Denault ve Salvesen 2002, Kroemer ve Reed 2000).



Şekil 1.5. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozis yolağı (Zimmermann ve ark. 2001).

Mitokondrial apoptotik yolu, Bcl-2 ailesine ait olan apoptotik faktörler etkiler. Bcl-2, hücrenin çoğalması desteklemesi yerine hücre ölümü inhibe edilen ilk onkogen belirlenmiştir. Hücre döngüsünün S-fazına girişi geçiktirerek ilerlemesini düzenleyen Bcl-2 proteini ilk bulunan proto-onkogendir (Vaux ve ark. 1988). Bcl-2, kesinlikle yaşam fonksiyonları için Bcl-2 homolog bölgeye (BH1-BH4) sahiptir. Bcl-2 protein ailesinin üç tane grubu vardır. İlk grup Bcl-2 ve Bcl-X_L gibi anti-apoptotik proteinler, ikinci grup Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinler ve üçüncü grup Bad, Bik, Bid, ve Bim gibi pro-apoptotik proteinlerdir. Bcl-2 ve Bcl-X_L, Bcl-2 protein ailesinin en önemli olan anti-apoptotik üyeleridir (Cory ve Adams 2002, Mund ve ark. 2003).

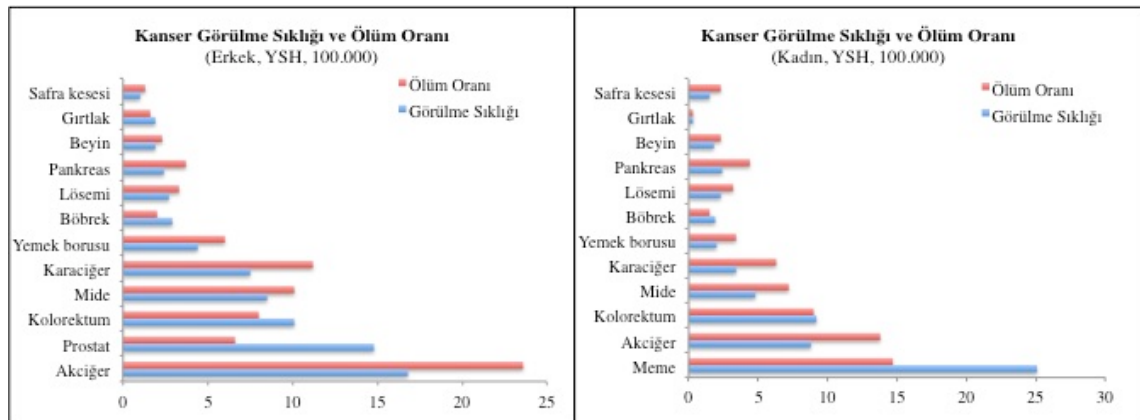
Apoptozisdeki Bcl-2 ailesinin rolünü açıklamak üzere pek çok model ortaya çıkmıştır. Bir modele göre Bcl-2 üyeleri kaspazların aktivasyonu doğrudan kontrol etmektedirler (Strasser ve ark. 2000), oysa diğer modele göre mitokondrial bütünlüğü koruyarak görev yaptıkları ileri sürülmektedir (Wang 2001). Conradt ve Horvitz (1998) tarafından önerilen modele göre, BH3-only üyeler transkripsiyonel upregülasyonu (Bax, Noxa, Puma), subselüler yerleştirme (Bim, Bmf), defosforilasyonu (Bad), ve proteoliz (Bid) gibi mekanizmalarla aktifleştirilmektedirler. Aktive edilmiş BH3-only proteinleri pro-apoptotik üyeleri inhibisyonda anti-apoptotik Bcl-2 üyeleri engellemektedir. Sonuç

olarak, proapoptotik faktörler apoptozom oluşumunda ve kaspaz aktivasyonunda rol oynayan sitokrom c gibi sitoplazmaya mitokondri iç zarından serbest bırakılır (Gewies 2003). Bu faktörler mitokondriden sitokrom c'nin serbest bırakılmasını engeller. Ayrıca mitokondriden gelen düzenleyici proteinler olarak bilinen apoptozis inhibitör proteinler kaspaz aktivitesini inhibe edebilmektedir.

1.3.Kolorektal Kanser

Kolon ve rektum birlikte yaklaşık 2 metre uzunluğundaki karının sağ alt çeyrek dairesinde bulunan sindirim sisteminin kalın bağırsak deneni kısmını oluşturur. Kolon ve/veya rektal duvarlarında polip olarak adlandırılan ya malign ya da benign olabilen tümörler oluşturabilir. Benign polipler zamanla adenoma polipler oluşturabilir ve aslında kolorektal kanserin %95'i adenomatöz poliplerinden oluşmaktadır. Poliplerde oluşan kanserleşme zamanla kolon ve rektal duvarlarında büyümeye başlar ve daha malign bir hal alır. KRK akciğer, kemikler ve beyin gibi vücudun uzak kısımlarına yayılabilmektedir (Anonim, 2016c).

2012 yılında Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafınca yayımlanan GLOBACAN verilerine göre, kolorektal kanser, erkeklerde üçüncü sırada yer alırken, kadınlarda ikinci sırada görülen kanser tipini oluşturmaktadır (Şekil 1.6). Avrupa'nın orta ve doğudaki ülkelerinde her iki cinsiyette toplam kanser ölümünün %8,5'i KRK nedeniyle olmaktadır (Ferlay ve ark. 2012). Türkiye'de ise Sağlık Bakanlığı'nın raporuna göre KRK görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde %8,3 ile kadınlarda üçüncü ve %9,1 ile erkeklerde üçüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2016d).



Şekil 1.6. Dünya'da kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları (Ferlay ve ark. 2012).

KRK'lerde ölüm oranını azaltmak amacıyla, gaitada gizli kan (GGK), sigmoidoskopi, GGK+sigmoidoskopi, çift kontrast baryumlu enema, fekal DNA testi ve kolonoskopi gibi birçok tarama testleri kullanılmaktadır. Kolon kanserinin başlangıç evresinde karında dolgunluk hissi, hafif ağrı, iştah kaybı, kilo kaybı, çabuk yorulma, ishal ya da kabızlık görülebilmektedir. Bu şikayetlerin olması durumunda hastanın mutlaka incelenmesi gerekmektedir (Anonim, 2016c).

KRK tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler uygulanmaktadır. Cerrahi tedavisi, kolonun tamamen veya bir kısmı ve yakındaki lenf düğümlerinin de alınmasını içerir. Radyasyon terapi, x-ray veya parçacıklar gibi yüksek enerjili ışınlar kanser hücrelerini öldürür. Kemoterapi radyasyon terapisini daha efektif yaptırabilir. Kemoterapide etkinliği arttırmak için iki veya daha fazla ilaçlar birlikte kullanılabilir. KRK için en çok kullanılan ilaçlar:

- 5-fluorourasil (5-FU), vitamin gibi bir ilaç leucovorin ile verilir
- Kapesitabin (Xeloda®)
- İrinotekan (Campstosar®)
- Oksaliplatin (Eloxatin®)
- Trifluridine ve tipirasil, tek veya kombinasyon olarak (Anonim, 2016e).

Kolorektal kanserin ileri evresinde, ana tedavi kemoterapidir. Klinikte özellikle 5-fluorourasil ve levamizol 6 ve 12 aylarında hastalara verilmektedir. Karaciğer ve akciğer metastaz yaşanan hastalar için ise 5-fluorourasil, leucovorin ve irinotekan ilaçlarla sistemik kemoterapi uygulanmaktadır. Adjuvan tedavi, kanser hastalığında ana tedaviye yardımcı bir tedavi yöntemidir. Tümörün boyutu, özellikleri ve yayılımına bakarak koruyucu tedavi olarak uygulanan yöntemlerle (kemoterapi, hormon tedavisi, akıllı ilaç ve radyoterapi tedavileri), kanserin yenileme ihtimalini azaltmayı hedefler. Adjuvan tedavisine ameliyetten 8 hafta sonra başlanması önerilmektedir (Chau ve Cunningham 2006). Adjuvan tedavisinde genel verilen ilaç kombinasyonları FOLFLOX (5-FU, leukovorin, oksaliplatin), CapeOx (kapesitabin, oksaliplatin), ve 5-FU ile leukovorin kombinasyonudur. FOLFLOX ve CapeOx daha etkili olduğu düşünülmekte ama yan etkiler daha fazla olmaktadır.

1.3.1.Risk Faktörleri

En yüksek risk artışı genetik temelli olsa da, KRK'lerin çoğunluğunu ailesel kanserden çok sporadik vakalar oluşturmaktadır (Wei ve ark. 2004). Sporadik KRK için yaş en

büyük risk faktörüdür. Epidemiyolojik çalışmalar yaş, cinsiyet, adenomatöz poliplerin kişisel geçişi, ailesel öykü, çevresel faktörler, beslenme düzeni, sigara, alkol tüketimi ve fiziksel hareketsizlik gibi risk faktörler olarak gösterilmiştir (Anonim 2016f).

50 yaşı ve üzerinde olanlarda kolorektal kanser sık olarak görülmektedir. Kanser istatistik verilerine göre 2008 ve 2012 yılları arasında yeni kolorektal kanser vakasının %20'si 55 yaşın altında, %21,5'i 55 ve 64 yaşlar arasında, %23,9'u 65 ve 74 yaşlar arasında, %22,6'sı 75 ve 84 yaşlar arasında ve %12,2'si ise 84 yaş üzerinde olduğu belirtilmektedir. Erkeklerde KRK sebebiyle ölüm oranı daha yüksek olmaktadır. 2008 ve 2012 yıl arasında kolorektal kanserin 100.000 kişide belirlenen insidansi erkeklerde 48,9 iken kadınlarda 37,1 olarak belirlenmiştir (Ferlay ve ark. 2012).

Çevresel faktörler KRK'nin gelişme olasılığını artırmaktadır. KRK riskine çevresel faktörlerin etkisi oldukça fazladır. Bu çevresel faktörler beslenme düzeni, sigara, ağır bir şekilde alkol tüketimi, fiziksel hareketsizlik ve şişmanlık gibi faktörlere dayanmaktadır. Yüksek et tüketimi ve yağ özellikle hayvan yağı açısından zengin bir beslenme düzeni KRK'in önemli riskleri arasındadır (Larsson ve Wolk 2006). Kolorektal kanserden ölümlerinin %12'si sadece sigara içmeye bağlı olduğu belirlenmiştir (Tsong ve ark. 2007). Özellikle genç yaşlarda alkol tüketiminin fazla olması KRK riskini arttırmaktadır (Longnecker ve ark. 1990). Şişmanlık hem erkekler hem de kadınlarda KRK riskini arttırmakta özellikle erkeklerde daha etkili olduğu belirtilmektedir (Shimizu ve ark. 2003).

1.4.Likenler

Hastalıkların tedavisinde bitkisel ilaçlar uzun zamandır pek çok ülkede geleneksel olarak kullanılmaktadır (Malhotra ve ark. 2007). Gelişmekte olan ülkelerde terapötik madde olarak bitki materyalleri birinci sırada yer almaktadır (Shukla ve ark. 2010). Günümüzde, ilaç sanayinde likenler gibi aşağı bitkileri de kapsayan çeşitli organizmaların tıbbi potansiyelleri araştırılmaktadır (Boustie ve Grube 2005). Halen klinikte bitkilerden izole edilmiş doğal ürünler vinkristin, vinblastin, etoposid, paklitaksel, kamptotesin, topotekan, irinotekan gibi ilaçlar kullanılmaktadır (Bhanot ve Sharma 2011, Demain ve Vaishnav 2011).

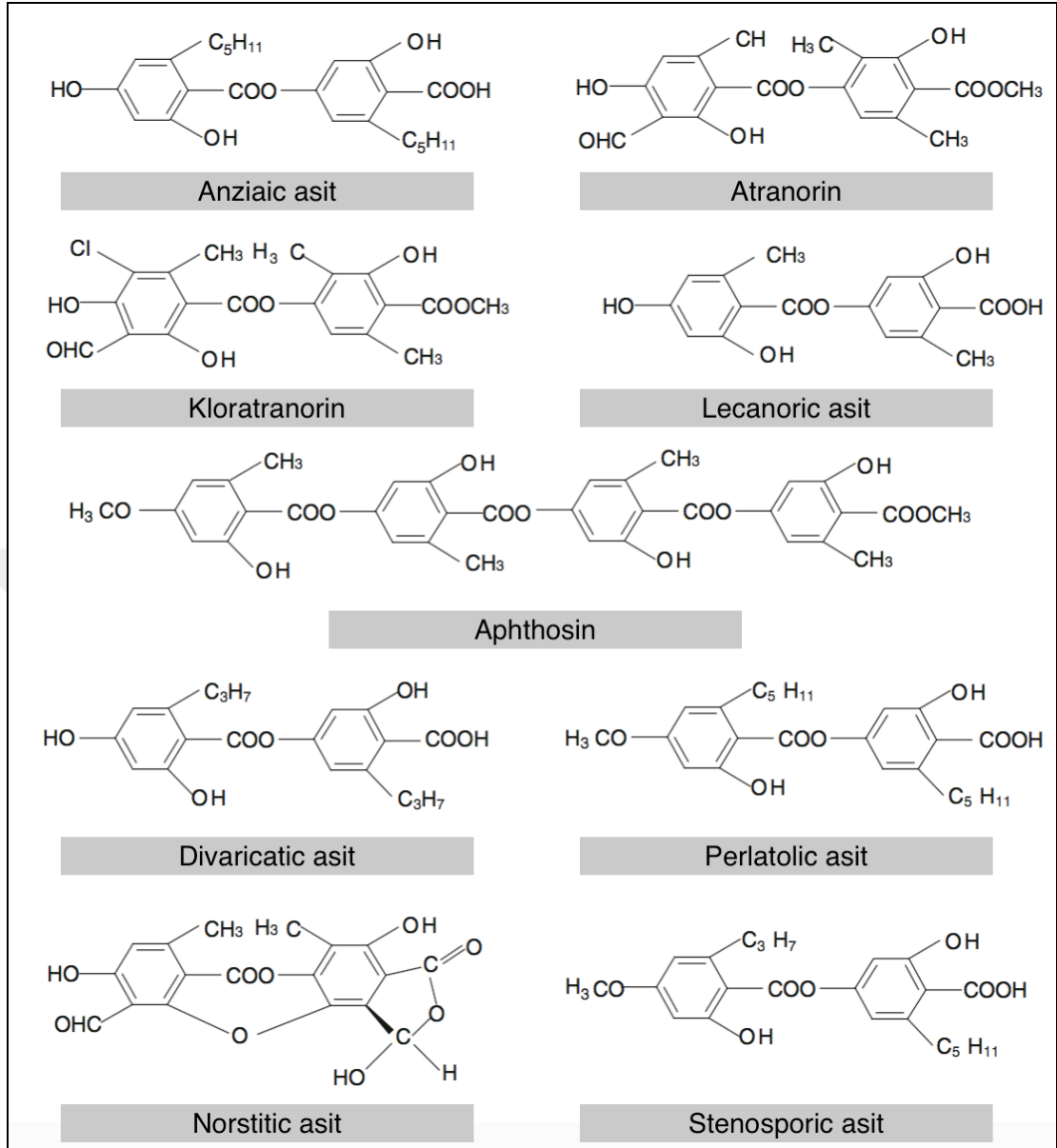
Likenler, bazı mantarlar (çoğunlukla *Ascomycetes*) ve fotosentetik alglerden (çoğunlukla *Chlorophyta*) meydana gelen simbiyotik ve mutualistik (her iki ortağın da fayda sağladığı) birlikteliklerdir. Şekil ve yaşayış bakımından kendilerini oluşturan alg

ve mantarlardan tamamen ayrı bir yapı gösterirler. Renksiz bir mantar hifinden oluşan tallusun yapısına katılan fotosentetik canlı (fotobiyont), genellikle yeşil alg ya da bir siyanobakteridir; fakat bazen sarı-yeşil alglerden veya kahverengi alglerden de oluştukları bilinmektedir. Simbiyotik organizmalardan alg, klorofil taşıdığından fotosentez yapar ve birliğin karbohidrat gereksinimini karşılar. Mantar ise su ve madensel maddelerin alınmasında görev alır (Cocchietto ve ark. 2002). Likenler, yılda 36,6 milimetrelik büyüme oranı ile en yavaş büyüyen bitkilerden biridir. Yaklaşık olarak 18500 liken türü bilinmektedir (Feurerer ve Hawksworth 2007).

Yeryüzündeki çoğu ekosistemde ağaç (epifitik), kaya (epilitik) ve toprak (epigeik) gibi çeşitli tipte 'substrat' (tutundukları ortam) üzerinde gelişen bitkisel canlılardır (Çobanoğlu 2015). Dünyada geniş bir yayılışa sahiptirler ve denizlerden yüksek dağlara, sıcak bölgelerden kutuplara kadar değişiklik gösteren alanlarda ve zor koşullarda bulunurlar. Likenler bulunduğu kayaları parçalayarak toprak oluşumuna katkı sağlarlar (Cocchietto ve ark. 2002). Likenler kan ve kalp hastalıkları, bronşit, uyuz, astım, karın ve karaciğer ağrısı, cüzzam, büyümüş dalak, yanma hissi, kusma, ve hazımsızlık tedavisinde kullanılmaktadır (Shukla ve ark. 2010, Zambare ve Christopher 2012).

1.4.1.Likenlerin Biyolojik Etkinlikleri

Liken maddeleri olarak adlandırılan sekonder (ikincil) metabolit varlığı likenlerin özgün yönlerinden biridir (Şekil 1.7). Bunlar ağırlıklı olarak mantarlar tarafından amorf ya da kristal formunda üretilir ve liken hiflerin yüzeyine salgılanırlar (Mitrovic ve ark. 2011b). Küçük moleküller baskın olmalarına rağmen, sekonder metabolitler likenin %20 kuru ağırlığını oluşturmaktadır. Huneck (1999)'ya göre, liken maddelerinin esas görevleri iyice anlaşılmamış olmakla birlikte, virüs, bakteriler, protozoon parazitler, böcekler ve nematodlar gibi organizmalara karşı, çevresel stres faktörleri, ultraviyole ışınlar ve aşırı kuruluğa karşı likenin korunmasını ve liken metabolizmasının düzenlenmesini sağlarlar. Kimyasal yapılarına göre liken maddelerinin çoğu alifatik, sikloalifatik, aromatik ve terpen bileşikleridir. Uzun zamandan beri likenlerden elde edilmiş suda çözülmeyen metabolitler ilaç olarak kullanılmaktadır (Singh ve ark. 2013).



Şekil 1.7. Bazı liken maddeleri ve kimyasal yapıları (Shukla ve ark. 2010).

Bu bileşiklerin üretilmesi için enerji ve karbon kaynaklarının yüksek oranda kullanılması sebebiyle bunların savunma mekanizmasında önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. Liken maddelerinin %50'den fazlası simbiyotik ilişkiyi sürdürmek ve çeşitli abiyotik ve biyotik faktörlerden korunmak için sentezlenir (Correche ve ark. 2002). 800 taneden fazla liken maddesi tanımlanmıştır ve hala yeni maddeler keşfedilmektedir (Zambare ve Christopher 2012). Bu bileşiklere olan ilgi, koruyucu farmakoforlar olarak potansiyel kaynak olmalarından ileri gelmektedir (Correche ve ark. 2002). Bilinen liken maddelerinin bazıları depsidler, depsidonlar, kromon, ksanton,

dibenzofuran, emodin, antrakınon, androkokin, pulvinik asit, terpenilkinonlar ve terpendir. Çeşitli liken türlerinden birçok kimyasal madde izole edilmiştir. Sekonder metabolitlerdeki fenolik yapılar oksidatif strese karşı korunma mekanizmasına katkı sağlamaktadır (Hidalgo ve ark. 1994). Esas olarak atronorin, evernik, fisodik ve usnik asit gibi liken asitleri bazı metabolik enzimlerin güçlü inhibitörleridir. Enteresan şekilde bu enzimler poliamin metabolizması ile ilişkili arjinaz, arjinin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz gibi önemli enzimler olabilmektedir (Legaz ve ark. 2001, Matsubara ve ark. 1998, Kinoshita ve ark. 2002). Liken polisakkaritlerden depsidler ve depsidonlar antitümör, immün sistemi uyarıcı ve antiviral özellikleri dolayısıyla özellikle ilgi çekmektedirler (Olafsdottir ve Ingolfssdottir 2001).

Likenlerde en çok bulunan sekonder metabolitler depsid ve depsidonlardır. Literatürde depsidonların çoğunun antioksidan etki gibi önemli fizyolojik özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir (Manojlovic ve ark. 2012). Ayrıca depsideler ile depsidonlar karşılaştırıldığında depsidonların daha etkili olduğunu gösterilmiştir (Hidalgo ve ark. 1994). Depsidonlar polisiklik yapısından dolayı hem eter bağı hem de ester bağına sahiptir. Bu kimyasal özelliğin inhibitör aktivite için önemli olduğu gösterilmiştir (Neamati ve ark. 1997). Depsidon ve depsid bileşiklerden pannarin, 10-kloropannarin ve sphareoparinin lenfositler üzerinde yüksek sitotoksik aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Correche ve ark. 2002). 15 liken metabolitinin fare hepatositlerinin primer kültürü üzerine etkileri değerlendirilmiş ve bunlar arasında salazinik asit, stiktik asit, ve psoromik asit gibi bileşenlerin en etkili apoptotik depsidonlar olduğu gösterilmiştir (Correche ve ark. 2004).

1.4.2. *Usnea* cinsinin taksonomisi ve morfolojik özellikleri

Usnea (Parmeliaceae) çalı gibi türleri, radyal simetrik solgun sarımsı yeşil dalları, ağışsı, tallusu ve kıkırdaklı merkez eksenli olan bir cinsdir (Ohmura 2002, Wirtz ve ark. 2006). En kolay tayini yapılan cinslerden biri *Usnea* cinsidir. Dünya çapında özellikle kutup ve tropikal alanlarında bulunan 700'den fazla bildirilen türleriyle *Usnea* yaygın olarak dağılım gösteren epifitik bir liken cinsidir (Kirk ve ark. 2008). Ancak bildirilmiş türlerinin neredeyse yarısının sinonim olduğuna inanılmaktadır (Clerc 1998). *Usnea* cinsinin fotobiyontlar kısmı iyi çalışılmamış olmasına rağmen, *Trebouxia* ve *Trentepohlia* cinsi tek hücreli yeşil algleri içerdiği belirlenmiştir (Balarinova ve ark. 2013, Rafat ve ark. 2014, Friedl ve Budel 2008). Diğer bir yeşil alg cinsi olan

Poterioochromonas cinsinin de, *Usnea longgisima*'nın tallusunda bulunduğu saptanmıştır (He ve Zhang 2012).

Liken tallusuna ait olan bir dizi morfolojik karakter *Usnea* türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Örneğın tallusun taban kısmının rengi, segmentasyonun sıklığı, ikincil dallanma durumları ve üreme yapılarının yapısı tayinde kullanılabilmektedir (Clerc ve Herrera-Campos 1997, Clerc 2006). *Usnea* cinsinde bulunan likenlerin sınıflandırılması ilk olarak onların morfolojik karakteristiklerine dayansa da tür düzeyinde tayin ve fotobiyontların ayırımı için yeterli değildir. *Usnea*'nın tür düzeyinde morfolojik tanımlanması çoğunlukla vejetatif formda ortaya çıkan yakın morfolojik benzerlikler dolayısıyla oldukça zordur (Clerc 1992).

Taksonomistler *Usnea* cinsinde türleri ayıt etmek için tallusun renk ve uzunluğu, yerleşim şekli, ana dalların kalınlığı, tallusun taban kısmının pigmentasyonu, fibril yapıları, korteks çıkıntıları, korteks parlaklığı, korteks papillaları, korteksin kalınlığı, medulla ve merkezi eksen, coğrafik ayrılma gibi çeşitli karakterleri kullanmaktadırlar. Usnik asidin yüksek konsantrasyonu pek çok *Usnea* türünde tipik olarak sarı yeşil tallus rengi oluştururken, düşük konsantrasyonu yeşilimsi tallus rengine sebep olabilmektedir. Bundan dolayı, tallusun rengi teşhis karakteri olarak iyi bir özellik değildir tavsiye edilmez (Clerc 1998).

Randlane ve ark. (2009) medulla renginin tür düzeyinde tanımlamada taksonomik bir karakter olabileceğini rapor etmiştir. Bununla birlikte, türler arasında medulla renginde çeşitlilik olduğu da belirlenmiştir. Örneğın, *Usnea strigosa* beyazdan kırmızıya kadar çeşitlilik gösterir ve bu varyasyon usnik asit, norsistik ve psoromik asit gibi organik asitlerin varlığı ya da yokluğu ile ilgili olmamaktadır (Randlane ve ark. 2009).

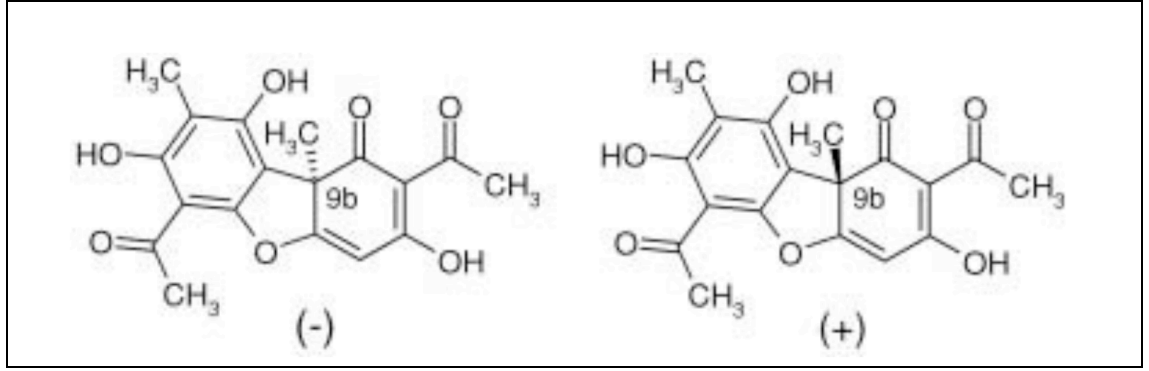
1.4.3.Usnik Asit

Usnea cinsinin çeşitli türlerinin antifungal, antibakteriyel, analjezik, ateş dürücü, anti-enflamatuvar gibi biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Usnea türüleri ve bazı biyolojik aktiviteleri (Shukla ve ark. 2010)

Liken Türü	Karakterize edilmiş metaboliti	Biyolojik Aktivitesi
<i>U. campestris</i>	Usnik asit	Antifungal ve antibakteriyel
<i>U. diffracta</i>	Diffraktaik asit, usnik asit	Analjezik ve ateş dürücü
<i>U. diffracta</i>	Diffraktaik asit, usnik asit	Anti-enflamatuvar
<i>U. diffracta</i>	Dekarboksi stenosporik asit	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>U. longissima</i>	Usnik asit, depsid	Fotosistem II inhibitörü
<i>U. longissima</i>	Usnik asit	Bitki büyüme inhibitörü
<i>U. longissima</i>	Likesterinik, usnik asit ve evernik asit	Epstein-Barr virüs aktivasyonun inhibe etmesi
<i>U. misaminensis</i>	Usnik asit	Düz kas gevşetici

Usnea cinsinden karakterize edilmiş bileşikler arasında usnik asit antikanser özelliği ile non-genotoksik bileşik olarak ilgi çekmektedir (Mayer ve ark. 2005). Usnik asit [2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-dibenzofuran-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandione; $C_{18}H_{16}O_7$; moleküler ağırlığı: 344.315 g/mol] sarı ve kristal biçimindedir (Ingolfssdottir 2002). Bu biyoaktif bileşik *Ramalina*, *Cladonia*, *Lecanora*, *Evernia* and *Parmelia* gibi diğer bazı cinslerde de bulunmaktadır (Cansaran ve ark. 2006). 9b pozisyonundaki metil grubunun oryantasyonu ile değişen usnik asidin iki enansiyomer formu (-) usnik asit ve (+) usnik asit vardır (Şekil 1.8) (Cocchietto ve ark. 2002). Bu yaygın liken metaboliti tıbbi biyoaktiviteleri geniş bir şekilde incelenmiştir. Usnik asit likenlere ait bir sekonder metabolit gibi görülmektedir. Usnik asidin yüksek dozlarda hücre membran bütünlüğü etkileyerek hepatotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Oksanen 2006). Yine oksidatif fosforilasyon ve mitokondriyel solunumda hasarlara neden olmaktadır (Oksanen 2006). İnsan lösemi (K526) ve endometriyal karsinoma (İshikawa ve HEC-50) hücre soyları üzerinde usnik asidin antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Usnik asidin ökaryotik protein kinazları inhibe ederek bazı bitki patojenleri üzerine antifungal aktivitelere sahip olduğu da bildirilmiştir (Zambare ve Christopher 2012).



Şekil 1.8. (-) ve (+) Usnik asidin kimyasal yapıları

Usnik asidin esas biyolojik rolünün; çok yavaş büyüyen likenlerde, antibiyotik aktivite göstererek mikroorganizmalara karşı kimyasal bir koruyucu olarak üretilmesi olduğuna inanılmaktadır. Bu durum muhtemelen likenlerin yüzyıllarca yaşayabilmesinden kaynaklanmaktadır. Usnik asit liken maddeleri arasında en etkili antibiyotiktir. Ghione ve ark. (1988) dental plak oluşumuna neden olan *Streptococcus mutans* üzerinde usnik asidin antibakteriyel etkisini araştırmış ve (+) enantiomerin plak ve çürük oluşumunu önlediğini göstermiştir. Bugün bazı ağız bakımı ürünleri içinde (+) usnik asit bulunmaktadır. Diğer çalışmalarda usnik asidin stafilokoklar, enterokoklar, anaerobik bakteriler, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, ve *Staphylococcus aureus* gibi diğer bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktiviteye neden olduğu belirlenmiştir (Cocchietto ve ark. 2002).

Tümör-promotor uyarıcı Epstein-Barr virüs ve Papilloma virüs genital enfeksiyonuna karşı (+) usnik asidin antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. (+) usnik asitin Afrika maymunlardan elde edilen herpes simplex tip I ve poliotip II virüsleri ile enfekte edilmiş böbrek hücreleri üzerindeki sitopatolojik etkiyi inhibe ettiği belirtilmektedir (Scirpa ve ark. 1999).

1.4.4.Usnea filipendula Stirt

Usnea filipendula Stirt (Yaygın adı: Balıkkılçığı Sakal Likeni) soluk gri-yeşil renkli bir likendir ve asılı şekilde gelişim formu ile ağaç gövdelerinde 20 cm'e kadar uzayabilen çok dallı püsküllü yapıya sahiptir (Şekil 1.9). Bu liken türleri Pasifik Kuzeybatı'da geniş bir alana yayılmıştır ancak esas olarak Cascades silsilesinin batısında bulunmaktadır. *Usnea scabrata* türüne benzer ancak daha koyudur ve daha kalın korteks ve farklı kimyaya sahiptir. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) metoduyla *Usnea filipendula*'nın ana bileşiği 1,8-Cineole (ökaliptol) belirlenmiştir (Timotius ve ark.

2015).



Şekil 1.9. *Usnea filipendula* Stirt. türünün morfolojik görüntüsü (Anonim 2009).

Bursa’da Uludağ’ın Abietum zonunda, 1500-1900 m’lik yükseklik alanı içerisindeki beş lokaliteden Uludağ göknar ağaçları (*Abies nordmanniana*) üzerinden kırkaltı epifitik liken kaydedilmiştir. Yükseklik Uludağ’daki Uludağ Göknar’ı üzerindeki epifitik likenlerin dağılımı ve çeşitliliğini kontrol eden başlıca faktörlerden biridir. Bu likenlerden birisi *Usnea filipendula*’dır (Öztürk ve Güvenç 2010). *Quercus* türleri üzerinden *Quercus cerris*, *Quercus petraea*, ve *Quercus iberica* gibi *Usnea filipendula* tayin edilmiştir (Tore ve Öztürk 2009, Oran ve Öztürk 2012). Mustafa Kemalpaşa ilçesinde 710 m’lik yükseklik alanında *Pinus* türü üzerinden (Yazıcı ve Aslan 2006) ve İnegöl ilçesinde *Fagus orientalis* üzerinde *Usnea filipendula* türünün varlığı rapor edilmiştir (Oran 2011).

Eskişehir’in kuzeyindeki Sündiken Dağlarında 43 cinse ait toplam 93 liken türü bulunmuştur. Türkiye’nin en önemli orman ağaçları olan *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, ve *Pinus brutia* Sündiken Dağlarında bulunmaktadır. Bu bölgede yeni kaydedilen liken türü ise *U. filipendula*’dır (Yılmaz ve ark. 2015). Bolu bölgesindeki Abant gölün kuzeyi ve güneyinde *Abies nordmanniana* ve *Pinus sylvestris* ağaçlardan *Usnea filipendula* tayini gerçekleştirilmiştir (Çobanoğlu ve Akdemir 2004).

Artvin’da Çoruh vadisinde yapılan çalışmasına göre 41 liken cinse ait olan 94 tür

tanımlanmıştır. 450-1100 m'lik yükseklik alanı içerisindeki *Fagus orientalis* üzerinden *Usnea filipendula* kaydedilmiştir (Aslan ve ark. 2002). Osmaniye bölgesinde yapılan çalışmada *Picea orientalis* üzerinden (Yazıcı ve ark. 2008), İsparta'da ise *Quercus vulcanica* üzerinden (Oran ve ark. 2007), Gaziantep'de ise *Pinus sylvestris* üzerinden *Usnea filipendula* tayinleri gerçekleştirilmiştir (Halıcı ve ark. 2007).



2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Materyal

2.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Lonza
- Fetal Sığır Serum (FBS), Biochrome AG
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco
- % 0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries
- Trikloroasetikasit (TCA)
- Asetik asit
- Sulforhodamine B (Santa Cruz)
- Tris Baz (TBS)
- Muse Kaspaz 3/7 Kit (Millipore)
- Adenozin 5-trifosfat (ATP) Biyoluminesans Kit (Sigma)

2.1.2.Kullanılan Sarf Malzemeler

- 25 cm² ve 75 cm²'lik flask, Orange Scientific
- 6 kuyulu plate, Orange Scientific
- 96 kuyulu flat plate, Orange Scientific
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit
- 100µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Ayset
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (15 ml), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (50 ml), Nest
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning Incorporated Corning

2.1.3.Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- CO₂ inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 10 μ l, 100 μ l ve 1000 μ l'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-5 μ l Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200 μ l Transferpipet, Brand, Almanya
- ELISA (Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay) reader
- Luminometre (FLx800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- Muse™ Cell Analyzer (Millipore, Almanya)

2.2.Yöntem

2.2.1.*Usnea filipendula* Liken Türünün Toplaması ve Tayini

Çalışmanın ana materyalini oluşturan *Usnea filipendula* Uludağ ve Bursa çevresindeki uygun lokalitelerden Mayıs 2010 yılında Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Şule Öztürk ve Arş. Gör. Dr. Seyhan Oran tarafından toplandı. Tayin anahtarları ve flora kitabı kullanılarak tayin edildi (Purvis ve ark.1994). Örnekler Uludağ Üniversitesi herbaryumunda kullanılıncaya kadar saklandı.

2.2.2.*Usnea filipendula* Liken Türünün Ekstraksiyonu ve Liyofilizasyonu

Ekstraksiyon ve liyofilizasyon işlemleri Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Serap Çelikler tarafından gerçekleştirildi ve tez çalışmasında hocamızdan temin edilerek kullanıldı. *Usnea filipendula* ekstaksiyonu

metanol ve su ile Sokslet ekstraktöründe gerçekleştirilmiş olup ekstraksiyon rotary evaporatör cihazında 40 °C'deki vakum altında yoğunlaştırılmıştır (25-30 dakika). Donmuş haldeki ekstraktlar kuru hale getirilmek üzere vakum altında, uygun koşullarda ve sıcaklıklarda liyofilize edilmiştir (41-42 saat). Liyofilize olarak temin edilen *Usnea filipendula* ekstresi tez çalışmasında kullanılmıştır.

2.2.3.Usnea filipendula Ekstraktının Hazırlanması

Usnea filipendula ekstraktının (UFE) stok çözeltisi 100 mg/ml (0,05 gr bitki ekstraktı + 0,5 ml DMSO) olacak şekilde DMSO ile çözülmesi sağlandı. Bu çözünmüş stoktan 20'şer µl olacak şekilde alikot yapılarak -80°C'de saklandı. Çalışmalar için gerekli seyreltmeler ise kültür besiyerinde (RPMI 1640) ile yapıldı.

2.2.4.Hücre Kültürü

Hücre kültürü, kontrollü şartlar altında hücrelerin bölünüp çoğalmasını kapsayan bir süreçtir. Çalışmamızda HCT-15 ve HT-29 insan kolon kanser hücre soyları kullanıldı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir.

HCT-15 Kolon Kanser Hücre Soyu

- Erkek hasta'dan izole edilmiş
- Dukes tip C, adenokarsinom
- Epitelyal morfolojisine sahip
- Keratin pozitif
- KRas pozitif

HT-29 Kolon Kanser Hücre Soyu

- Kadın hasta'dan izole edilmiş
- Myc pozitif (viral onkogen)
- Ras pozitif
- Myb pozitif (viral onkogen)
- p53 pozitif
- Ros negatif
- Src negatif

2.2.4.1.Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla, -80 °C’de kriyovial içinde saklanan HCT-15 ve HT-29 hücre soyları sıcak su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde çözöldü. Hücre süspansiyonu; %5 (HCT-15 için) %10 (HT-29 için) FBS, %1 penisilin-streptomisin %1 L-glutamin (Gibco) ve %1 non-esansiyel amino asit (sadece HT-29 için) içeren 5 ml RPMI (“Rosewell Park Memorial Institute Medium”) besiyeri içersine alındı. Falkon tüp 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Falkon tüp üzerine 4 ml besiyeri ilave edildi ve 5 ml’lik hücre süspansiyonu 25 cm²’lik flasklar (Thermo Scientific) içersine alınarak 37 °C’de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.4.2.Hücre Soylarının Pasajlanması

Kullanılan hücreler 25 cm²’lik flaks yüzeyini tamamen kapladıklarında yani konfluent olduklarında flaks içersindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan tamamen arındırılması için 25 cm²’lik flaks içersine 2 ml 1X PBS ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. Flaks içersindeki PBS in aspire işleminde sonra flaks yüzeyine yapışan hücrelerin ayrılması için 0,5 ml %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37 °C’de, %5 CO₂’li ortamda 5 dk inkübe edildi. Flaks mikroskop altında bakıldığı zaman hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendi. Hücrelerin tamamı yüzeyden ayrıldıktan sonra tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Bu sayede yüzeyden ayrılan hücrelerin, hücre membranlarının tripsinden zarar görmesi engellenmiş oldu.

Flask içersindeki hücre süspansiyonu, içersinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 ml’lik falkon tüp içersine alındı. 800 rpm’e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözöndükten sonra 9 ml besiyeri ilave edildi ve 10 ml’lik hücre süspansiyonu 75 cm²’lik flasklara alınarak 37 °C’de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

2.2.4.3.Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içersindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS

aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C 'de %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp (Orange Scientific) içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifü yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerineher bir kriyovial için 1,5 ml dondurucu medium (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine bölünerek -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.4.4.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

HCT-15 hücre soyu için kullanılan besiyeri ortamı için %5 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin), %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 solüsyonu kullanıldı. HT-29 hücre soyu için kullanılan besiyeri ortamı için %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin), %1 L-glutamin, %1 esansiyel olmayan amino asit içeren RPMI 1640 solüsyonu kullanıldı.

2.2.4.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl 0,5 ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda % 0,5 tripan mavisi konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 12 µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde bulunan hücre sayısı hesaplandı.

2.2.5.SRB (Sulforhadamine B) Metodu

SRB metodu hücre kültüründe sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan, hücrelerdeki total protein ölçümüne dayanan kolorimetrik bir metoddur. Bu metot, Amerika'da bu konularda referans merkez olarak kabul edilen NCI ("National Cancer Institute")'nin çalıştığı bir yöntem olduğundan, anti-kanser ilaç araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Sülforhodamin B (SRB) protein bağlayabilen anyonik bir boyadır. Triklorik asetik asit ile sabitlenen pH altında bazik aminoasitler ile elektrostatik bir kompleks oluşturur ve hızla renk değişimi gözlenir. Bu renk değişimi 560 ve 580 nm absorbanslar da kolayca ölçülür.

SRB Metodu İçin Kimyasalların Hazırlanması:

- %10 (w/v) TCA: 10 gram TCA, 100 ml deiyonize su ile 100 ml ye tamamlanarak % 10 (w/v) Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi elde edildi.
- %1 Asetik asit çözeltisi: 1ml aseik asit 99 ml su ile hazırlanarak % 1'lik astetik asit çözeltisi elde edildi.
- %0,4 w/v SRB: %1' lik asetik asit içinde hazırlandı.
- 10mM Tris baz: 121 mg tris bazı ise 100 ml deiyonize su ile tamamlanarak, 10 mM pH: 10,0 tris bazı elde edildi.

Pasajlama işleminden sonra 75cm²'lik flaks içerisinde konfluent olan hücreler, hücre pasaj protokolündeki gibi tripsin ile kaldırıldı. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözündükten sonra 9 ml besiyeri ilave edildi ve 10 ml'lik hücre süspansiyonu elde edildi. Hücreler, 96 kuyulu plate içerisine son hacim 200 μ l medium (RPMI 1640) içinde 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Kör (negatif kontrol) için kullanılacak kuyulara ise 200 μ l medium eklendi.

Liyofilize edilip saklanan liken örneği *Usnea filipendula* stok çözeltisi 100 mg/ml (0,05 gr bitki ekstraktı + 0,5 ml DMSO) olacak şekilde DMSO ile çözünerek hazırlandı. SRB testi için, liken örneğin farklı konsantrasyonları (1,56-100 μ g/ml) hücre besiyerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. HCT-15 ve HT-29 hücreleri sayılarak 100 μ l besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Hücrelerde ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200 μ l besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler 24, 48 ve 72 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

24, 48 ve 72 saatlik tedavi süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için her kuyuya 50 μ l TCA (Trikloro asetik asit) eklenerek +4°C' de 1 saat fikse edildi. Fiksasyon süresi sonunda plate ters çevrilerek TCA döküldü. TCA'yı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez deiyonze su ile yıkandı. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek döküldü. Yıkama sonunda SRB solüsyonundan her kuyuya 50 μ l eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda SRB plateden

dökülerek uzaklaştırıldı. Bağlanmış boyayı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez %1'lik asetik asitle yıkandı. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek döküldü. Yıkama sonunda platelerde ki kuyular içerisinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutulduktan sonra proteinlere bağlanan boyanın çözünebilmesi için 10 mM tris bazı (150 µl/kuyu) eklendi. Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için plate en az 10 dk 150 rpm'de shaker da inkübe edildi. Optik dansite ELISA okuyucuda 564 nm'de okundu.

% Canlılık hesabı:

İlaç uygulanmamış kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

%Canlılık= $[100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$

2.2.6.ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu

Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser (veya herhangi bir çeşit) hücrelerindeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanır (Andreotti ve ark. 1995). ATP seviyesi ölçümü lüminesans teknolojisine dayandığı için canlı hücre sayısı ile mükemmel bir korelasyon göstermektedir ve kolorimetrik bir test olan SRB testine göre daha hassas ve güvenilirdir (Ulukaya ve ark. 2008). ATP yöntemi; lüsiferinin Mg^{+2} iyonları ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmaya dayanmaktadır. Lüminesans sinyal (ATP konsantrasyonu) ile hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark., 1995; Mueller ve ark., 2004).

ATP testi için UFE'nın farklı konsantrasyonları (1,56-100 µg/ml) hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. HCT-15 ve HT-29 hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Ardından hücreler, 72 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Negatif kontrol (maksimum canlılık, MO, muamele uygulanmamış hücre kontrolü) için 200µl besiyeri içerisine 5×10^3 hücre ekildi. Pozitif kontrol (minimum canlılık, MI, %100 öldüren doz) olarak, 100 µl hücre süspansiyonu içerisine hücre ölümünü %100 indüklediği bilinen %1'lik Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) çözeltisinden 100 µl ilave edildi. Hücreler 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında her kuyudan 150 µl atılarak 50 µl ATP

kitinin (Sigma FLASC 1KT Adenosine 5' triphosphate bioluminescent somatic cell assay kit, St. Louis, MO) içinde yer alan hücre lizis tamponu (2X) eklendi ve hücre içerisindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresini takiben, 50 µl hücre süspansiyonu beyaz renkli 96 kuyucuklu ekim kaplarına aktarıldı ve ardından 50 µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Reaksiyon sonunda oluşan ATP miktarı (lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla) ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Böylece bileşiklerle muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin RLU değerlerine göre UFE'nin sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinildi. % Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{Canlılık} = [100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanası ortalaması} - \text{Kör}) / (\text{Kontrol hücre absorbanası ortalaması} - \text{Kör})]$$

2.2.7.Kaspazla Kırılmış Sitokeratin-18 (M30) Metodu

Apoptozis esnasında sitoskeletin önemli bir protein olan CK18 (sitokeratin 18) sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak, kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (Leers ve ark. 1999). M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Ueno ve ark. 2003). Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18, ELISA yöntemiyle saptanmaktadır. Bu özel CK18'i tanıyan M30 antikor hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de var ise, apoptozisin varlığı gösterilmiş olur (Leers ve ark. 1999).

Basit olarak, ELISA metoduyla M30 antijen fragmentini belirlemek için, HCT-15 ve HT-29 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 200 µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 72 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemekten üzerlerinden 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı. UFE'nin konsantrasyonu 100 µl içerisinde 200 µg/ml (son konsantrasyon 100 µg/ml) olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl taze besiyeri ilave edildi. İlaç uygulamalarını takiden hücreler 72 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

72 saatlik inkübasyon sonunda tüm kuyulara 10 µl %10'luk NP-40 (Sigma, St. Louis, MO) ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında 600 rpm çalkalayıcıda inkübasyona

birakıldı. Tüm kuyulardaki supernatant toplandı ve 2000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip M30 Apoptosense ELISA (M30-Apoptosense ELISA kit, Peviva, Bromma, Sweden) kit içeriğine uygun olarak çalışıldı. Supernatantlar, kitin içerisinde yer alan CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoru kaplı striplere 25 µl pipetlendi. Tüm örnekler üzerine 75 µl horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 4 saat boyunca 600 rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda örneklerle 250 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200 µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H₂SO₄ içeren 50 µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 450 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu. Okunan absorbans değerlerinden elde edilen standart grafikten U/L değerleri hesaplandı.

2.2.8.Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

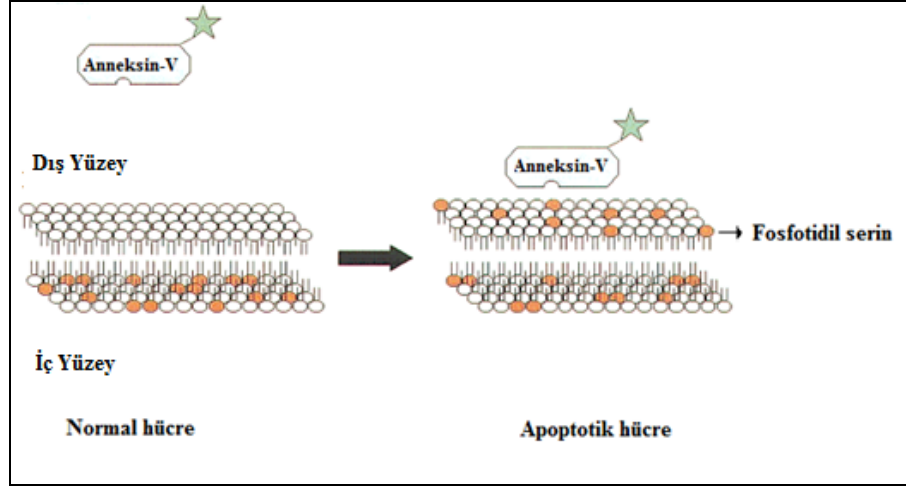
2.2.8.1.Hoechst 33342 Boyama Metodu

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen dolayısıyla hücre membranından nüfuz edebilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik/ nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır. Hoechst boyama yöntemi kullanılarak ekstraktla muamele uygulanmış hücrelerin ölüm şekilleri, nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilmektedir. Apoptotik hücrelerde; çekirdeğin normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği aranmaktadır.

Hoechst boyama yöntemi için; 96 kuyulu plate de her kuyuda 200 µl içerisinde 5×10³ hücre/ml ve UFE'nin konsantrasyonları (100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 12,5 µg/ml) olacak şekilde ekim yapıldı. Ardından hücreler 72 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 5 µl Hoechst (Cell Viability Imaging Kit; nuclei dye, Roche, Mannheim, Germany) 5 ml PBS içerisine pipetlendi ve kısa bir vorteks yapıldı. Her kuyuya 50 µl hazırlanmış olan bu karışımdan ilave edildi ve hücreleri kaldırmamaya dikkat edilerek pipetaj yapıldı. 37°C, %5 CO₂'li ortamda 30 dakika inkübasyon sonrasında floresan mikroskop altında değerlendirildi.

2.2.8.2. Anneksin-V ve Propidyum İyodür Boyama Metodu

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan PS bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozisle ölürse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar (Şekil 2.1). Bu yer değiştirme apoptotik hücrelerde henüz membran bütünlüğünün bozulmadığı yani ölümün erken dönemlerinde meydana gelmektedir (Van Engeland ve ark. 1998). Anneksin-V hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilebilmekte ve floresan mikroskobu ile incelenebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Propidyum iyodür (PI), sadece membran hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekrozis ise piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup apoptozisin geç safhasıdır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boyalarla boyanamazlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadırlar. Hücreler eş zamanlı olarak Anneksin-V-Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile boyanır. Canlı hücreler; Anneksin V-/PI-, erken apoptotik hücreler; Anneksin V+/PI- ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; Anneksin V+/PI+ boyanırlar ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilirler (Güleş ve Eren 2008, Ulukaya ve ark. 2011).



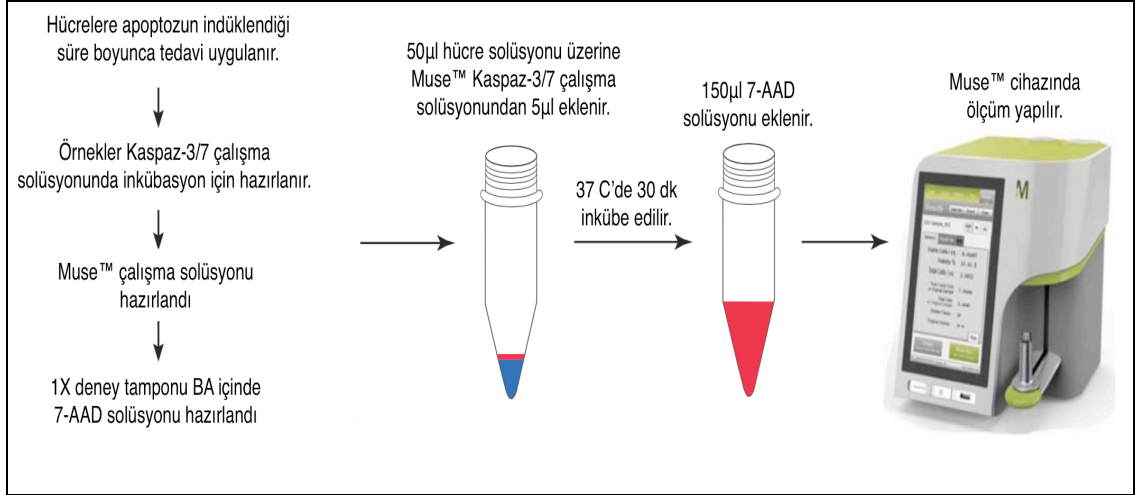
Şekil 2.1. Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Van Engeland ve ark. 1998’den değiştirilerek alınmıştır).

HCT-15 ve HT-29 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 200 µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı ve sonrasında UFE’nın konsantrasyonları (100µg/ml, 50µg/ml ve 25µg/ml) olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Negatif kontrol kuyularına 100 µl besiyeri ilave edildi. İlaç uygulamalarını takiden hücreler 12 ve 24 saat süreyle 37 °C, %5 CO₂’li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreleri zedelemekten üzerlerinden tüm besiyeri (yaklaşık 180 µl) uzaklaştırılarak Anneksin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Mannheim, Germany) içeriğine uygun olarak çalışıldı. 500 µl inkübasyon solüsyonu içerisine 5 µl Anneksin-V-Fluorescein ve 5 µl PI boyası pipetlendi. Her kuyuya boya karışımından 30µL pipetlenerek yarım saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda ekstraktın hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirildi.

2.2.9. Akım Sitometri ile Hücre Ölüm Kinetiği Parametrelerinin Belirlenmesi

2.2.9.1. Kaspaz-3/7 Aktivitesi Analizi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptozis sürecinde önemli bir rol oynayan sistein proteazlardır. Bazı kaspazlar öncelikli olarak intraselüler kaskadın başlamasında rol oynarken, efektör kaspaz olarak adlandırılan kaspazlar ise apoptotik sürecin ileri aşamalarında rol alırlar. Efektör kaspazlar olan kaspaz-3/7 aktivasyonu apoptozisin ayırt edici özelliklerinden biridir. Bu efektör kaspazlar, kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi yapısal proteinlerin kırılması yoluyla hücresel yıkımda rol oynarlar (Portera ve Janicke 1999).



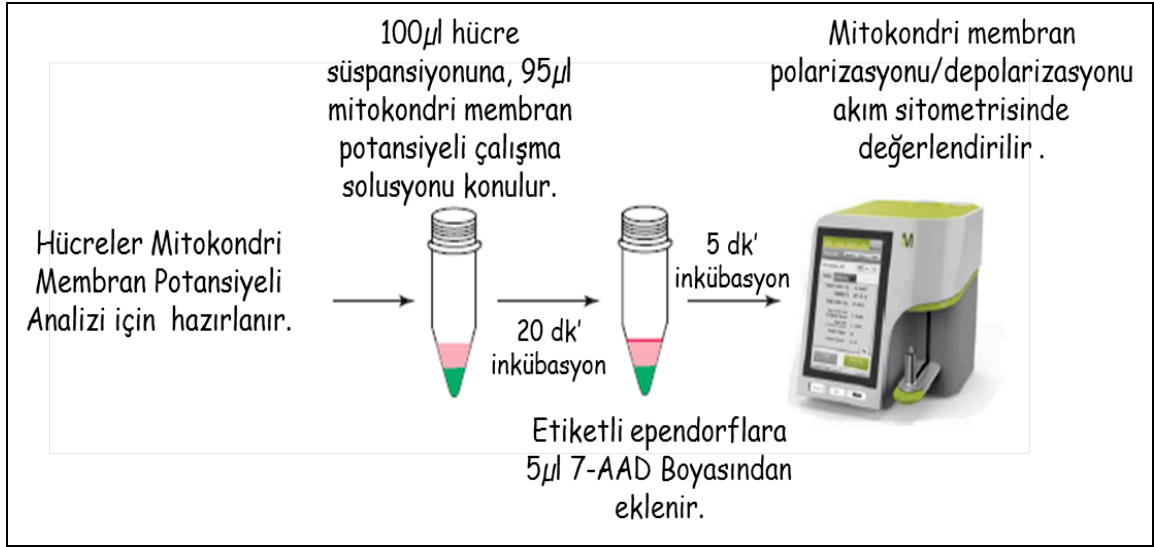
Şekil 2.2. Kaspaz-3/7 aktivitesi analiz basamakları

Kaspaz-3/7 aktivitesi testi için Muse™ Casapse-3/7 (Merck Millipore, Almanya) kullanıldı. Bu test için HCT-15 ve HT-29 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültürü kaplarına 1mL içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben UFE (100, 50, ve 25 µg/mL) farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak 1 ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1 ml taze besiyeri ilave edildi. 48 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda öncelikle kitin bileşiklerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreler serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden tripsin ile ayrılması sağlandı ve yüzeyden ayrılan hücreler ilgili falkonlara toplandı ve 1000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve elde edilen pelet sulandırılarak tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Daha sonra kaspaz-3/7 çalışma solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara 5 µl konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şekilde 37 °C, %5 CO₂'li ortamda 30 dk inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 µl DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetenaj gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığından karanlıkta 5 dk inkübasyon bırakıldı. Daha sonra Muse™ Cell Analyzer cihazında kaspaz-3/7 aktivitesi değerlendirildi (Şekil 2.2).

2.2.9.2.Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi

Mitokondride meydana gelecek değişiklikler hücre metabolizması ve stresi hakkında bilgi veren önemli belirteçlerdendir. Mitokondri apoptozis sürecinde önemli bir role sahip olan regülatörlerden biridir. Apoptotik yolların kesiştiği bir kavşak noktası olan mitokondri aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir. Bu yüzden apoptotik uyarıyı takiben, hücrelerde mitokondriyal bütünlüğün kaybı gözlemlenmektedir (Wen ve ark. 2013).

Mitokondri membran potansiyeli testi için, Muse™ Mitopotential Çalışma Kiti (Merck Millipore, Almanya) kullanıldı. Bu test için HCT-15 ve HT-29 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültürü kaplarına 1mL içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben UFE (100, 50, ve 25 µg/mL) farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak 1 ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1 ml taze besiyeri ilave edildi. 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda öncelikle kitin bileşiklerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreler serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden tripsin ile ayrılmaları sağlandı ve yüzeyden ayrılan hücreler ilgili falkonlara toplandı ve 1000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelleti elde edildi. Hücre peleti %1 FBS içeren PBS ile sulandırarak tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 100 µl eklendi. Ardından 95 µl çalışma soluyonu eklendi ve kısa bir pipetaj işleminin ardından hücreler 20 dk 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelere 5 µl 7-AAD boyası eklenerek orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı ve örnekler 5dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Mitokondri membran potansiyeli analiz basamakları.

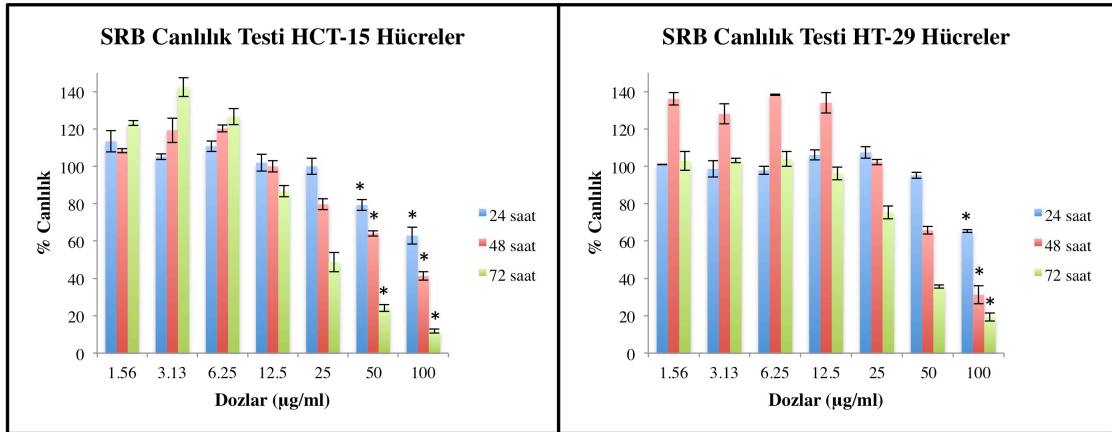
2.2.10. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler Stat 12 yazılımı kullanılarak One-way ANOVA ve Tukey post hoc test ile hazırlanmıştır. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p < 0,05$ değerine göre belirlendi. IC50 değerleri Microsoft Excel 2011 yazılımı kullanılarak hesaplandı.

3.BULGULAR

3.1.SRB Canlılık Testi Bulguları

UFE'nın farklı konsantrasyonlarının (1,56-100 µg/ml) HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için SRB canlılık testi yapıldı. Hücre soylarına 24, 48, ve 72 saat süre ile UFE uygulamasını takiben elde edilen sonuçlar Şekil 3.1'de gösterildi. UFE'nin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p<0,05$). UFE uygulanan HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının IC₅₀ (kontrol hücrelerine kıyasla tedavi sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC₉₀ (kontrol hücrelerine kıyasla tedavi sonrası hücrelerin %90'nını öldüren konsantrasyon) değerleri ise çizelge 3.1'de verilmiştir. UFE'nın 50 µg/ml ve 100 µg/ml dozlarının hücre soyları üzerine olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24, 48 ve 72 saat uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olduğu tespit edildi ($p<0,05$).



Şekil 3.1. UFE uygulanan HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının canlılık yüzdelерinin grafiğı.

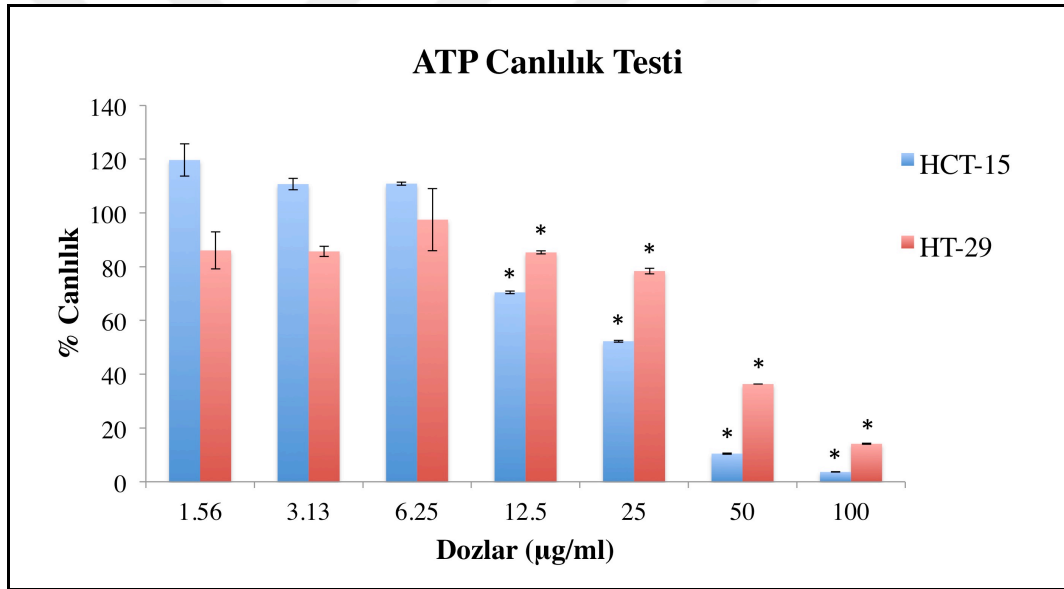
*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

Dozlar (µg/ml)	HCT-15	HT-29
IC ₅₀	17,20	40,94
IC ₉₀	>100	>100

Çizelge 3.1. UFE uygulanan hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri.

3.2.ATP Canlılık Testi Bulguları

ATP canlılık testi ile hücrelerde canlılığın bir göstergesi olan intrasellüler ATP miktarı ölçüldü. SRB canlılık testinde alınan sonuçlardan yola çıkarak UFE'nin 72 saatte en etkili olmasından dolayı 72 saatlik SRB sonuçları ATP canlılık testi ile doğrulandı. UFE'nin farklı konsantrasyonlarının (1,56-100 µg/ml) 72 saat tedavi sonrasında HCT-15 ve HT-29 hücre soylarında intrasellüler ATP miktarına olan etkisi şekil 3.2'de gösterildi. IC50 ve IC90 değerleri ise çizelge 3.2'de verilmiştir. UFE'nin 72 saat sonra uygulamasının HCT-15 ve HT-29 soylarında doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Özellikle 12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p<0,05$). HCT-15 hücre soyunun HT-29 hücrelerine oranla UFE'ye daha duyarlı olduğu belirlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. UFE uygulanan HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının 72 saat sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği.

*Kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

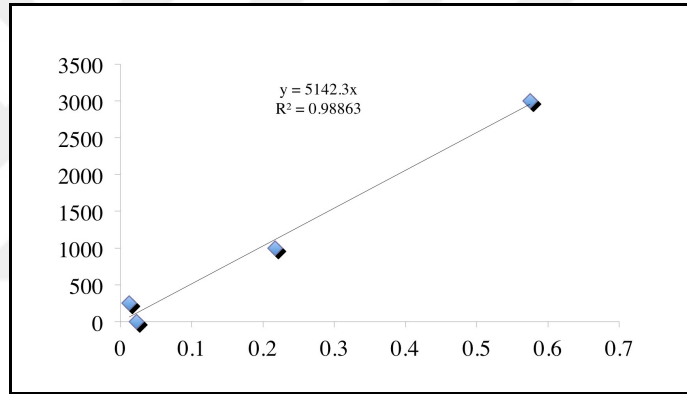
Dozlar (µg/ml)	HCT-15	HT-29
IC ₅₀	26,36	41,87
IC ₉₀	>100	>100

Çizelge 3.2. UFE uygulanan hücre soylarında ATP canlılık testi sonuçlarına göre IC50 ve IC90 değerleri.

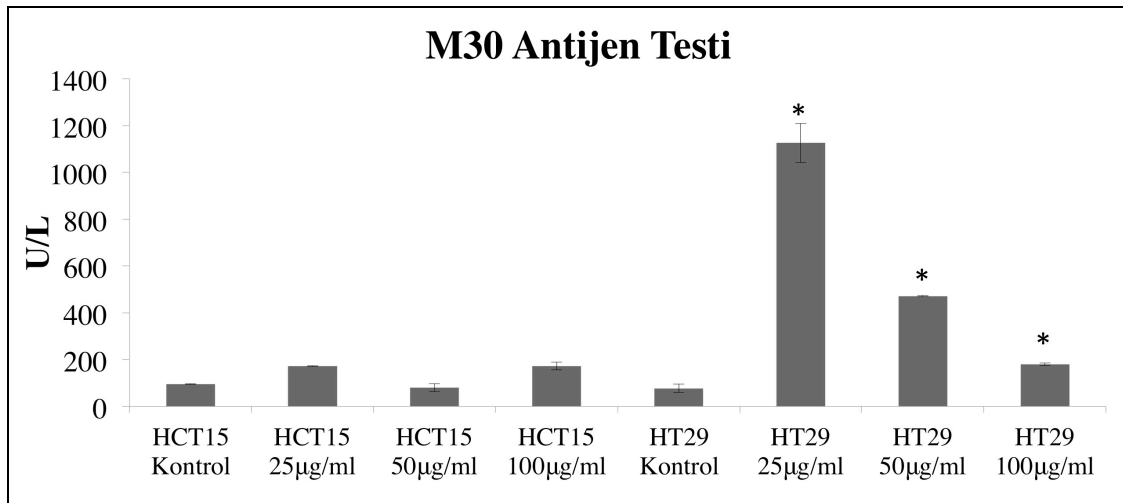
3.3.Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18 (M30) Metodu Bulguları

Hücre ölüm modunu araştırmak amacıyla UFE'nın her iki hücre soyunda sitotoksik bulunan konsantrasyonları (25, 50 ve 100 µg/ml) üzerinde apoptozise özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 (M30) düzeylerine bakıldı.

M30 ölçümlerinin değerlendirilmesi için öncelikle standart grafiği hazırlandı (Şekil 3.3). Ölçülen absorbanlar standart eğri grafiği yardımıyla belirlenen formülü üzerinden değerlendirilerek M30 miktarları (U/L) hesaplandı (Şekil 3.4). Şekil 3.4'de görüldüğü gibi, 100 µg/ml, 50 µg/ml ve 25 µg/ml UFE uygulamasının yalnızca HT-29 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu ($p<0,05$) buna karşılık bir diğer hücre soyu olan HCT-15' de az bir değişimin olduğu belirlendi. Ayrıca, HT-29 hücrelerinde en yüksek M30 seviyesinin 25 µg/ml dozda gözlenirken daha yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 50 µg/ml) azaldığı gözlemlendi.



Şekil 3.3. HCT-15 ve HT-29 hücre soyları ile yapılan çalışmanın M30 standart eğri grafiği.

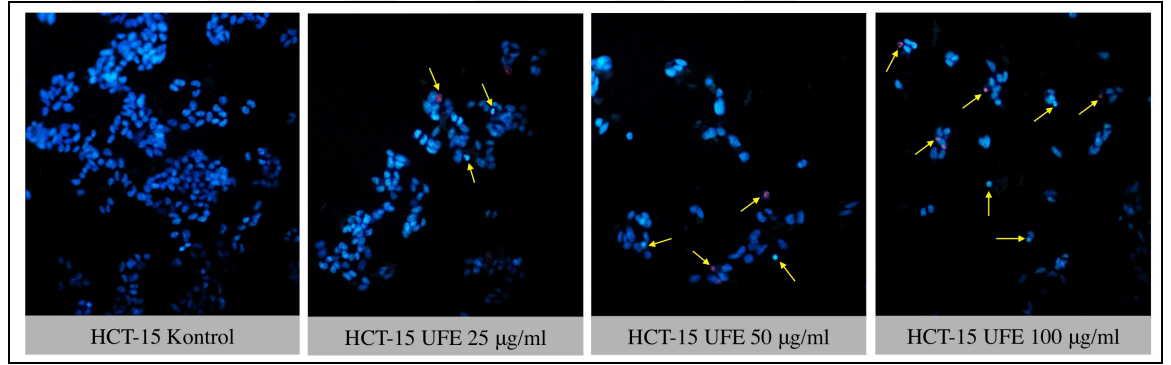


Şekil 3.4. 100 µg/ml, 50 µg/ml, ve 25 µg/ml UFE uygulamasından 72 saat sonra HCT-15 ve HT-29 hücre soylarında M30 seviyeleri. *Kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

3.4.Floresans Mikroskobu ile Morfolojik Değerlendirme Bulguları

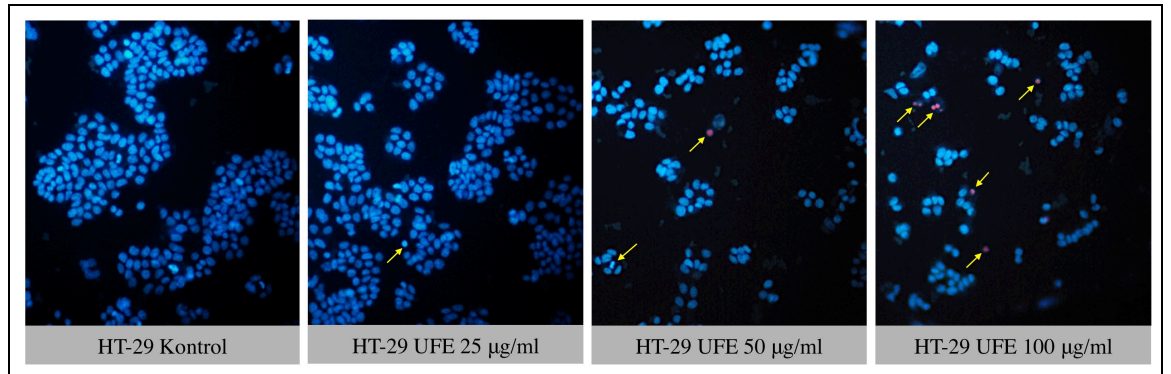
3.4.1.Hoechst 33342 Boyama Bulguları

Hoechst 33342 dsDNA'ya bağlanınca mavi floresans verilen bir nükleik asit bir boyadır. Apoptotik hücrelerde; nükleusun normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde nükleusun normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği arandı. HCT-15 ve HT-29 hücrelerin Hoechst 33342 boyama ile floresans görüntüleri Şekil 3.5 ve 3.6'de gösterilmiştir. UFE ile 72 saatlik muamele sonucunda, Hoechst boyası ile boyanan hücrelerde kontrole kıyasla her iki hücre soyunda da hücre yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı gösterildi. Her iki hücre soyunda da hücrelerin nükleus morfolojilerinin de değiştiği, kontrole kıyaslandığında apoptozis göstergesi olan piknotik nükleusların varlığı tespit edildi.



Şekil 3.5. Hoechst 33342 boyama ile HCT-15 hücrelerinin 72 saatlik muamele sonrasındaki floresans mikroskop görüntüleri.

→ Apotozisi göstergesi olan piknotik nükleusları göstermektedir.



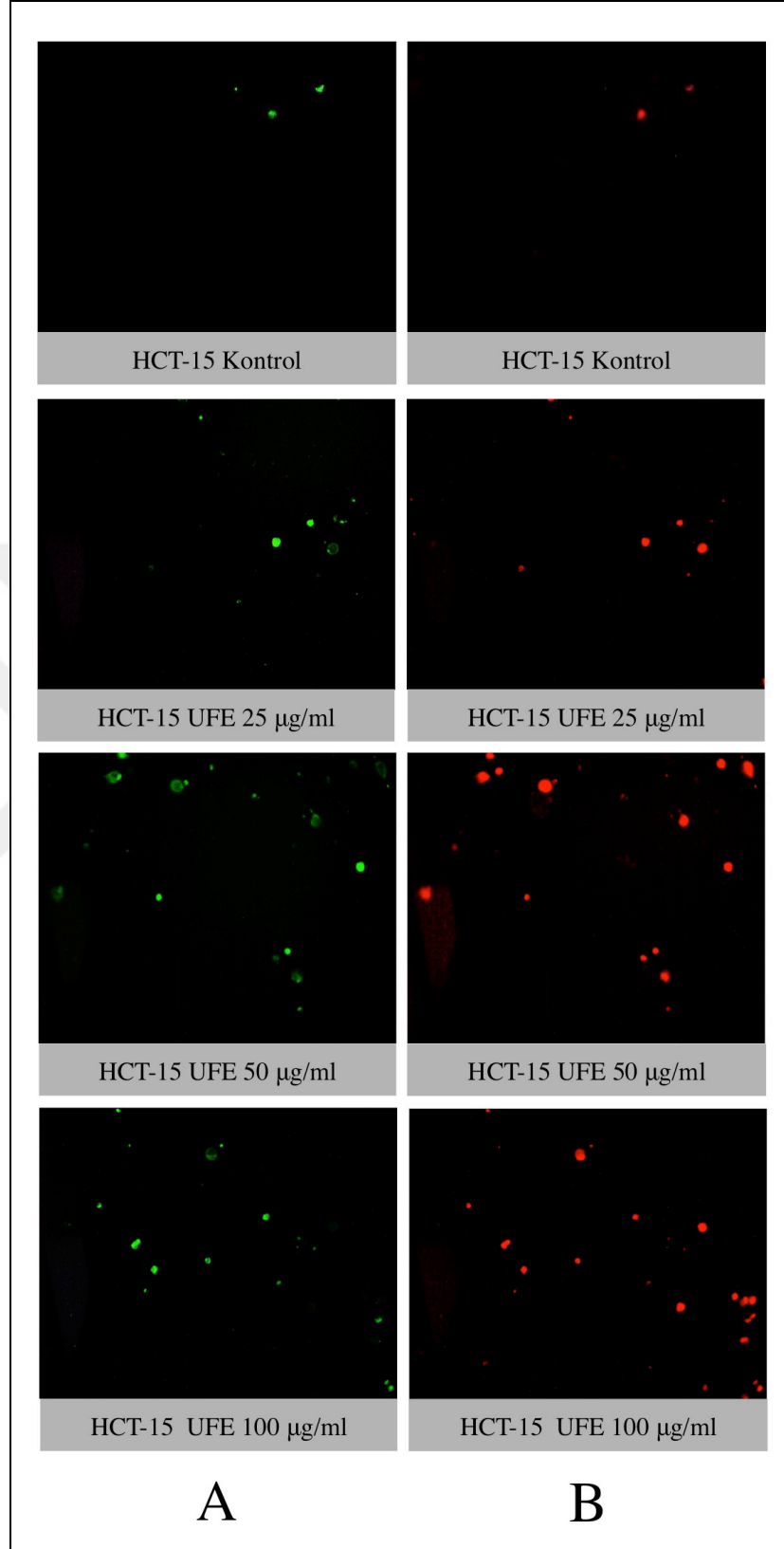
Şekil 3.6. Hoechst 33342 boyama ile HT-29 hücrelerinin 72 saatlik muamele sonrasındaki floresans mikroskop görüntüleri.

→ Apotozisi göstergesi olan piknotik nükleusları göstermektedir.

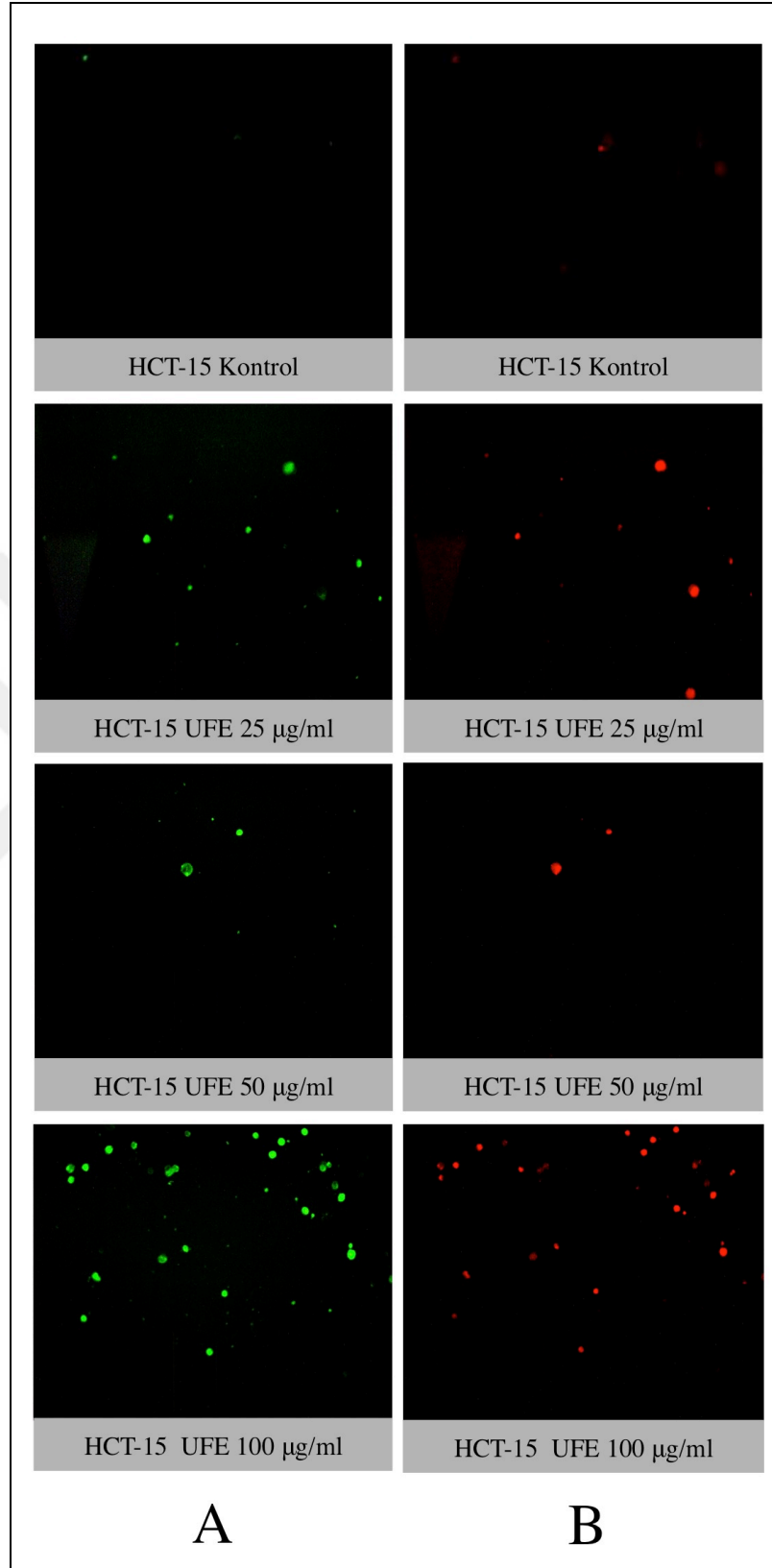
3.4.2. Anneksin-V ve Propidyum İyodür Boyama Bulguları

Normal hücrelerde PS hücrenin iç yüzeyinde bulunmaktadır fakat apoptozisin erken dönemlerinde PS hücre dış yüzeyine transloke olmaktadır. Floresan bir madde ile işaretlendiğinde apoptotik hücreler görünür hale getirilerek floresan mikroskobu altında incelenebilmektedir. Ayrıca nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Hücreler Anneksin-V Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan PI (kırmızı floresan) ile eş zamanlı olarak boyandığında; canlı hücreler Annexin-V (-) / PI (-), erken apoptotik hücreler Annexin-V (+) / PI (-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler Anneksin-V(+) / PI (+) sonuç verir.

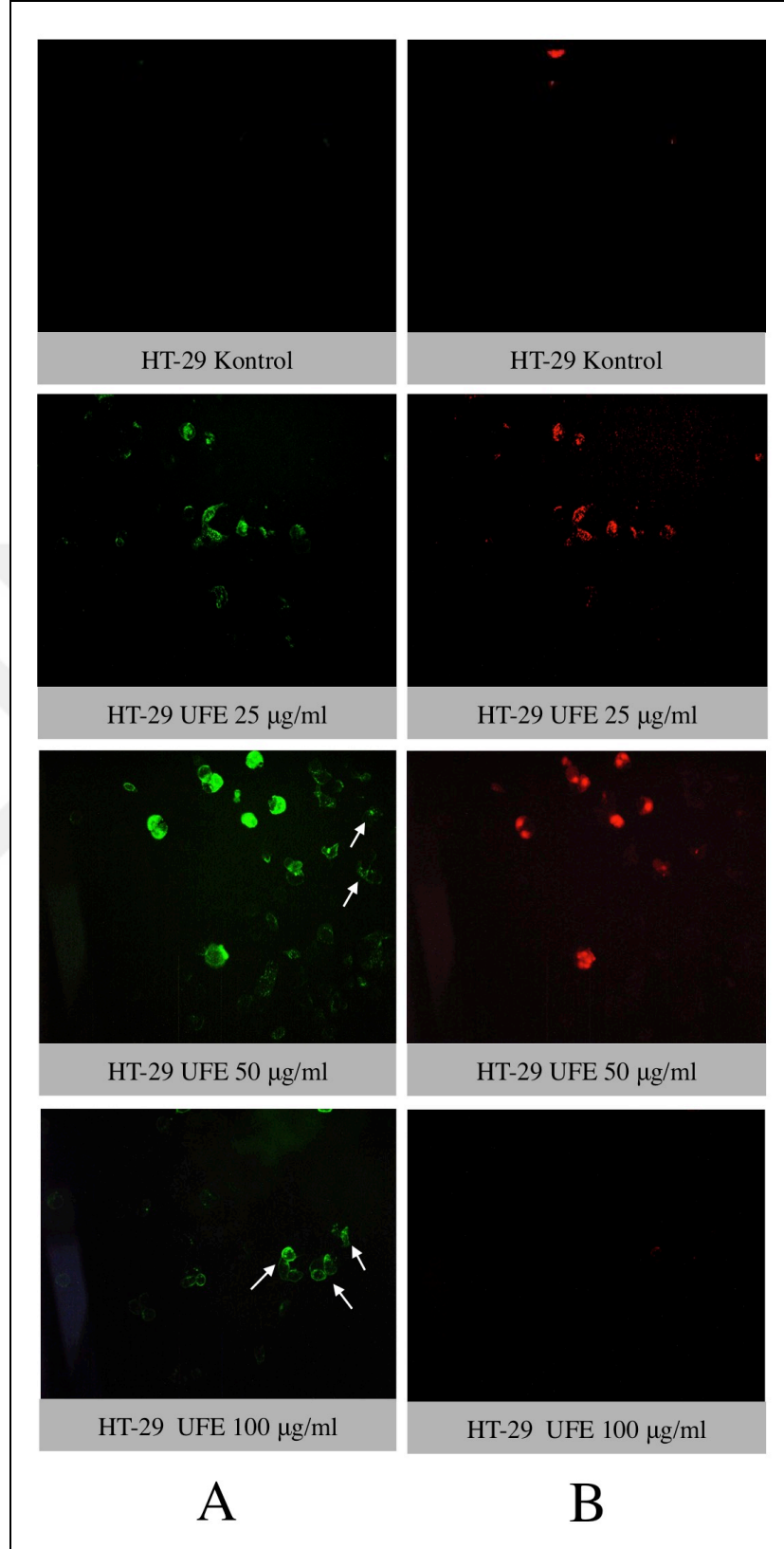
UFE'nin (100 µg/ml, 50 µg/ml ve 25 µg/ml) farklı konsantrasyonlarının HCT-15 ve HT-29 hücreleri üzerine 12 ve 24 saatteki etkisi Anneksin-V yöntemi kullanılarak floresans mikroskobu altında değerlendirildi (Şekil 3.7-3.10). Öncelikle HCT-15 ve HT-29 hücre soylarında doza ve zamana bağlı olarak hücre yoğunluğunun kontrole kıyasla azaldığı gösterildi. 100 µg/ml, 50 µg/ml ve 25 µg/ml UFE ile 12 ve 24 saat tedavi sonrasında HCT-15 hücrelerinde Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde aynı zamanda PI de pozitif sonuç verdiği için hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiği belirlendi. Bir diğer hücre soyu HT-29'un 100 µg/ml UFE 12 saat tedavi sonrasında Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde PI'nin negatif sonuç verdiği için hücrelerde erken apoptozis geliştiği belirlendi. 12 ve 24 saat süren tedavi sonrası HT-29 hücre soyunun diğer dozlarda ise hem Anneksin-V hem de PI pozitif sonuç verdiği, yani geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiği bulundu.



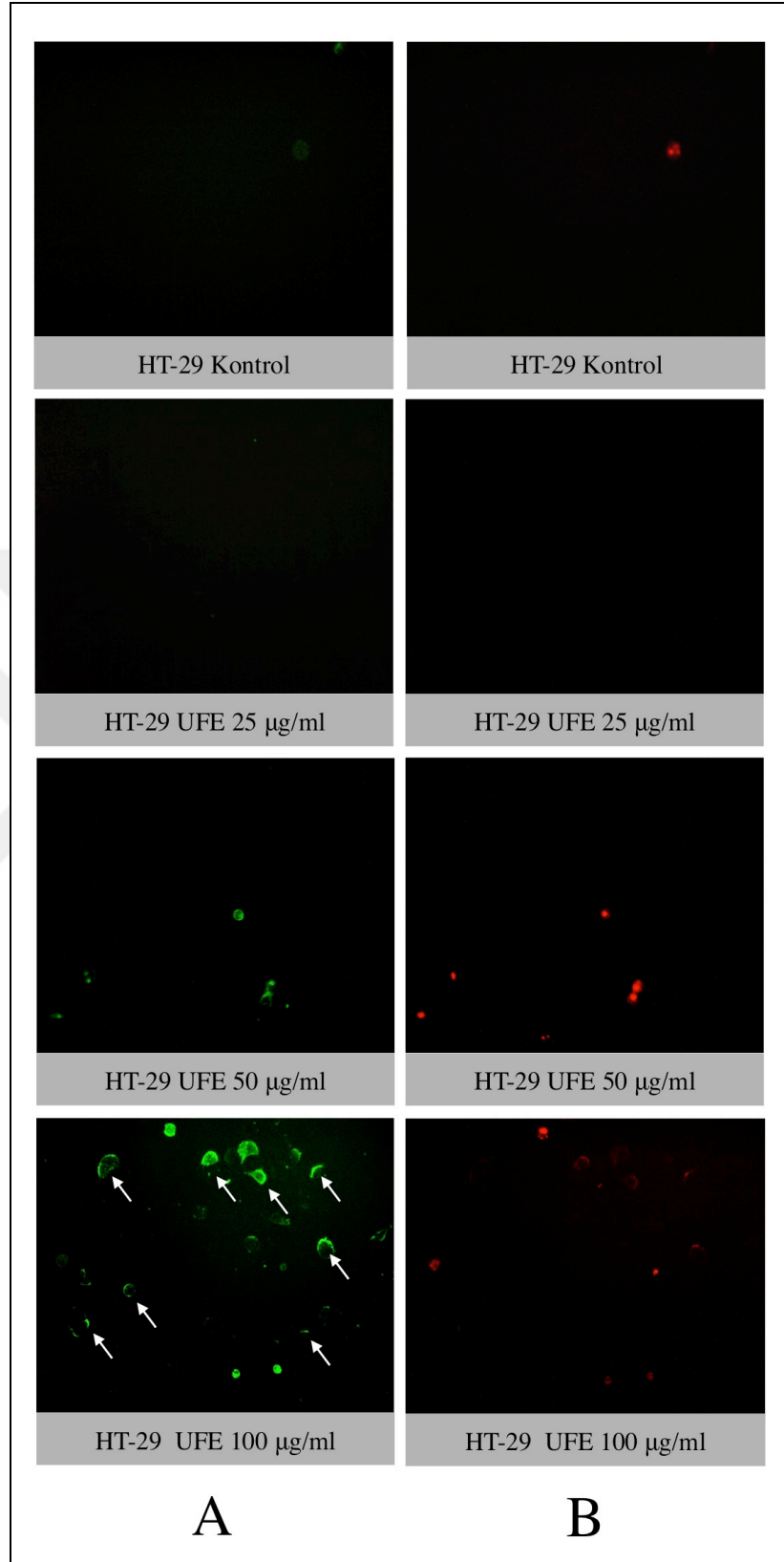
Şekil 3.7. HCT-15 hücrelerinin 12 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Anneksin-V ile boyama (yeşil), **B:** Propidyum iyodür boyama (kırmızı).



Şekil 3.8. HCT-15 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Anneksin-V ile boyama (yeşil), **B:** Propidyum iyodür boyama (kırmızı).



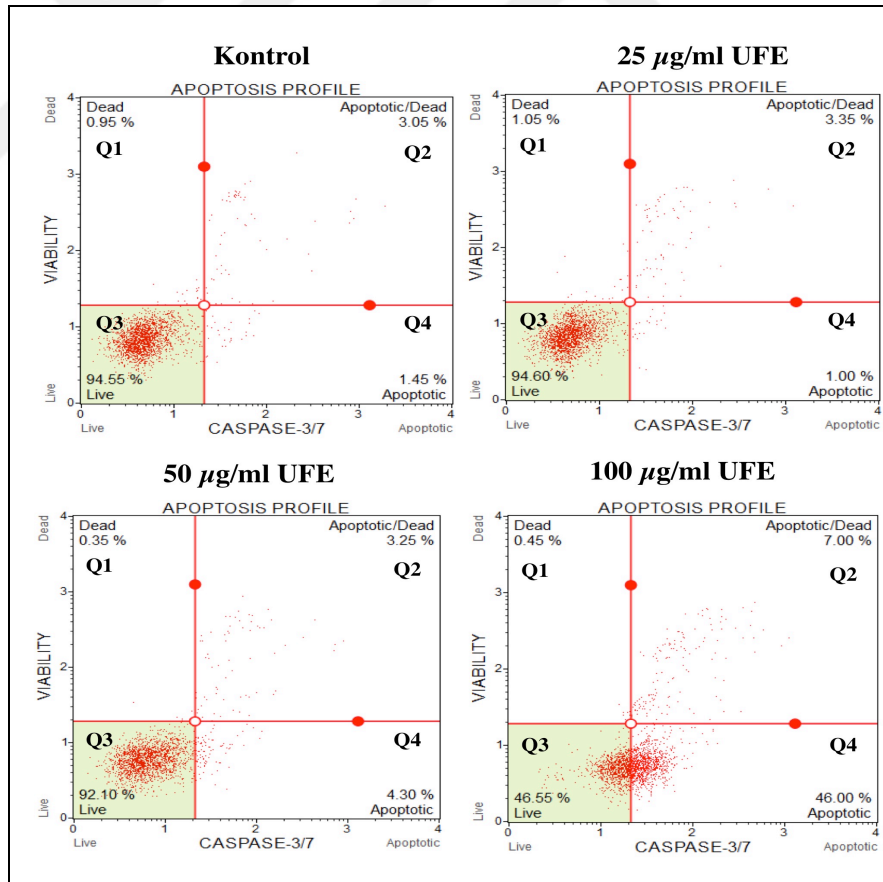
Şekil 3.9. HT-29 hücrelerinin 12 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Annexin-V ile boyama (yeşil), **B:** Propidyum iyodür boyama (kırmızı). →Erken apoptotik hücreleri göstermektedir.



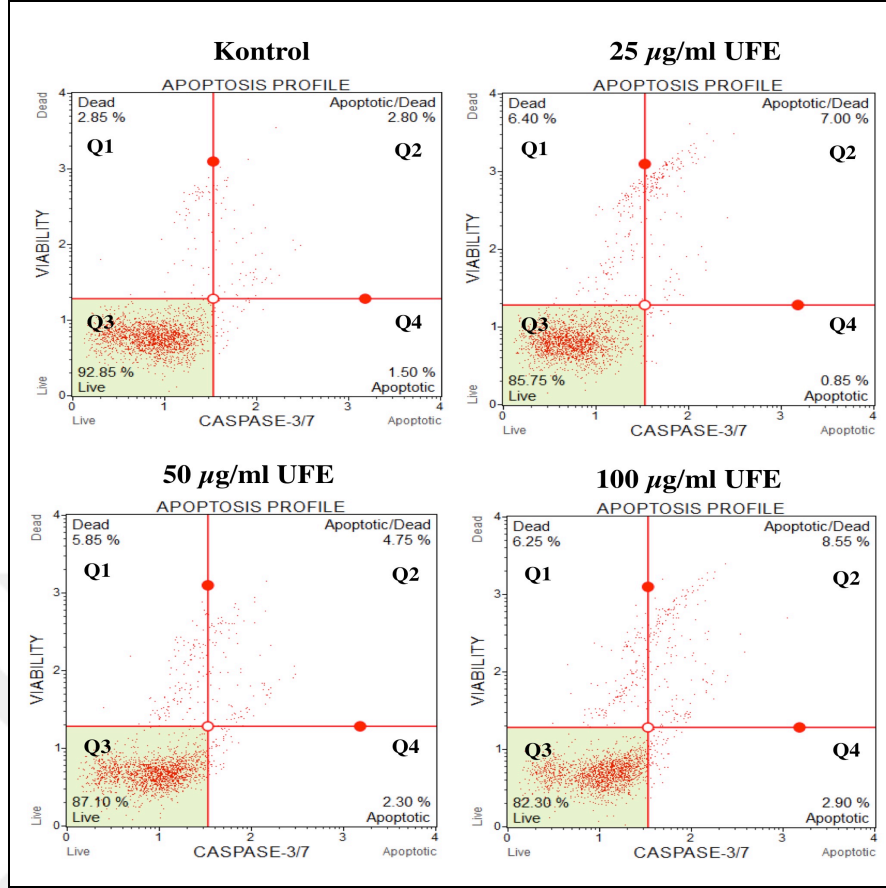
Şekil 3.10. HT-29 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Annexin-V ile boyama (yeşil), **B:** Propidyum iyodür boyama (kırmızı). →Erken apoptotik hücreleri göstermektedir.

3.5.Kaspaz-3/7 Aktivitesi Bulguları

Kaspazlar, apoptozis sürecinde önemli rollere sahip olan sistein proteazlardır. Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör kaspazlardan olan kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir. 48 saatlik UFE uygulaması (100, 50 ve 25 µg/ml) sonrasında Muse™ Cihazı kullanılarak HCT-15 ve HT-29 hücrelerinde kaspaz-3/7 aktivitesi incelendi. 48 saatlik tedavi sonrasında HCT-15 hücre soyuna uygulanan 100 µg/ml konsantrasyonda canlılık yüzdesi %46,55 (Q3), total apoptotik oran yüzdesi %53,0 (Q2+Q4); 50 µg/ml, 25 µg/ml konsantrasyonunda ise canlılık yüzdesinde ve apoptotik oran yüzdesinde kontrole göre değişim görülmedi (Şekil 3.11). 48 saatlik tedavi sonrasında HT-29 hücre soyuna uygulanan 100 µg/ml konsantrasyonda canlılık yüzdesi % 82,30 (Q3), total apoptotik oran yüzdesi % 11,45 (Q2+Q4); 50 µg/ml, 25 µg/ml konsantrasyonunda ise canlılık yüzdesinde ve apoptotik oran yüzdesinde kontrole göre farklı sonuçlar görülmedi (Şekil 3.12).



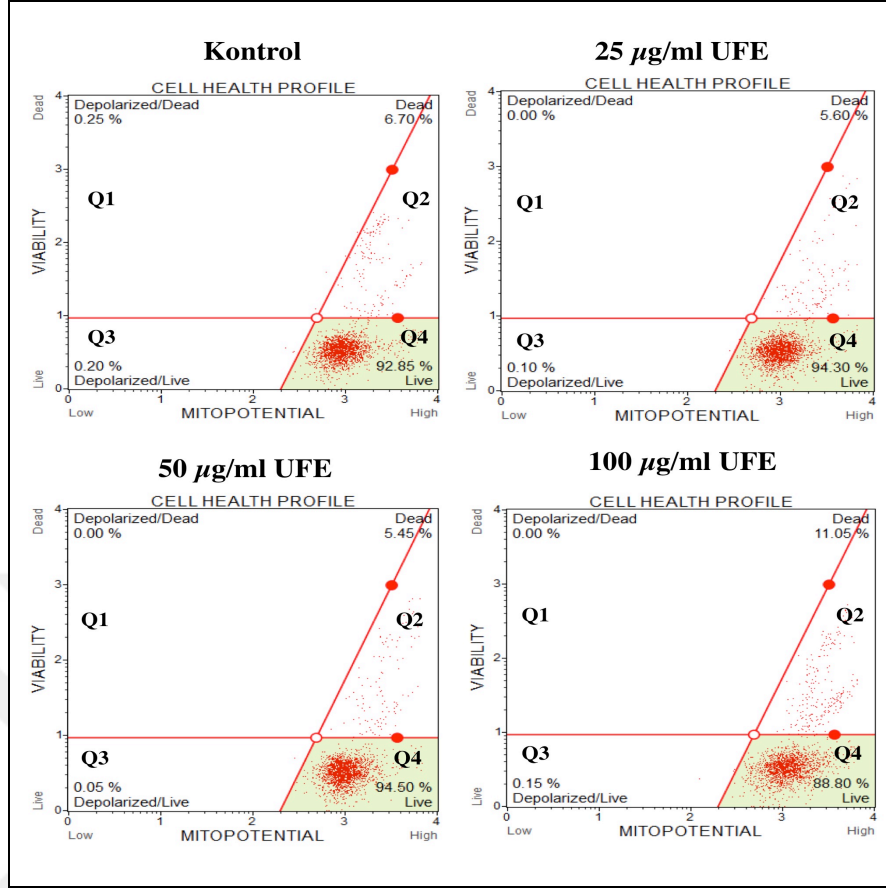
Şekil 3.11. UFE uygulanan (100, 50 ve 25 µg/ml) HCT-15 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz).



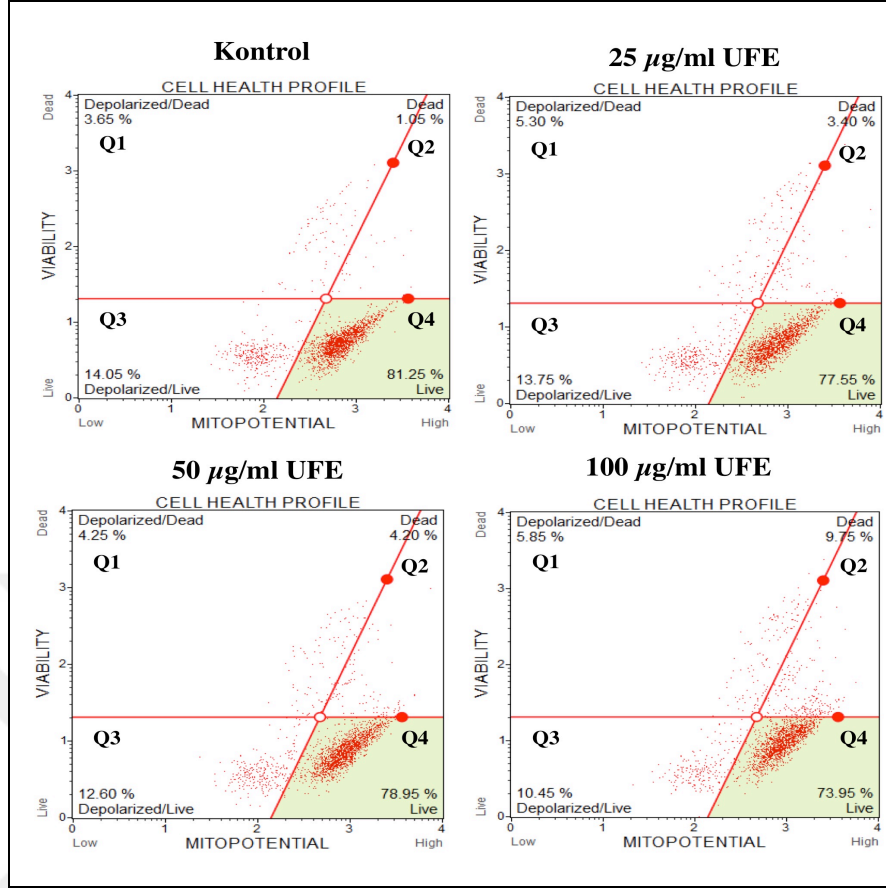
Şekil 3.12. UFE uygulanan (100, 50 ve 25 µg/ml) HT-29 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz).

4.6.Mitokondri Membran Potansiyeli Testi Bulguları

Mitokondri membran potansiyeli değişikliği erken apoptozis sürecinde görülen ve aynı zamanda hücresel stresin bir özelliği olarak düşünülmektedir. Mitokondri, hücrenin enerji dengesini korumak ve hücre ölüm süreçlerinde düzenleyici (regülatör) olarak görev yapan önemli bir hücre organelidir. Bu potansiyelin kaybı apoptozis, nekrozis ve kaspaz bağımsız hücre ölüm süreçlerinde görülebilmektedir. HCT-15 ve HT-29 hücrelerinin 48 saatlik UFE muamelesi (100, 50 ve 25 µg/ml) sonrasındaki mitokondri membran potansiyeli değişiklikleri Şekil 3.13 ve 3.14’de gösterilmiştir. HCT-15 hücre soyunda 48 saat süren UFE muamelesi sonucu mitokondrisi depolarize hücrelerin yüzdesinde kontrole göre önemli değişiklikler gözlenmedi. HT-29 hücre soyunda ise 100 µg/ml konsantrasyonunda kontrole kıyasla mitokondri membran potansiyelinde yaklaşık olarak %10 (Q3) bir azalma bulundu.



Şekil 3.13. UFE uygulanan (100, 50 ve 25 µg/ml) HCT-15 hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4=Canlı).



Şekil 3.14. UFE uygulanan (100, 50 ve 25 µg/ml) HT-29 hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4=Canlı).

4.SONUÇ VE TARTIŞMA

Kemoterapik ilaçlara karşı hızlı direnç gelişiminden dolayı kanser tedavisi için yeni ilaçların araştırılması halen öncelikli bir hedeftir (Kunjachan ve ark. 2013). Bazı kemoterapi ilaçlarının yüksek toksisiteleri ve yan etkilerinden dolayı yeni geliştirilen ilaçların özellikle kanser hücrelerine sitotoksik iken normal hücrelere daha az toksik olmaları, yan etkilerinin az olmaları istenir. Günümüzde klinikte çok sayıda antikanser ajan çeşitli doğal kaynaklardan (bitkiler, mantarlar, bakteriler, deniz organizmaları, ve mikroorganizmalar gibi) elde edilerek kullanılmaktadır. Örneğin vinkristin, vinblastin, etoposid, paklitaksel, kamptotesin, topotekan, irinotekan gibi antikanser ilaçlar bitkisel kökenlidir ve halen kanser tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar (Mann 2002, Prakash ve ark. 2013). Son zamanlarda likenler de içerdiği biyoaktif bileşenlerinden dolayı büyük bir dikkat çekmektedirler. Bu liken türlerinden biri de *Usnea filipendula* Stirt. türüdür.

Daha önce yapılan bir çalışmada, *Usnea filipendula* özütü insan akciğer kanseri (A549, PC3), karaciğer kanseri (Hep3B) ve fare glioma (C6) hücrelerinde apoptozis hücre ölümünde neden olduğu gösterilmiştir (Ari ve ark. 2014). Yine *Usnea filipendula* özütünün insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) PARP kırılması ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozisi indükleyerek sitotoksik olduğu belirtilmiştir (Kasimogullari ve ark. 2014). Bu tez çalışmasında ise *Usnea filipendula*'nın insan kolon kanser hücre soyları (HCT-15 ve HT-29) üzerinde sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında *Usnea filipendula*'nın metanol ekstratı kullanılarak HCT-15 ve HT-29 hücreleri üzerindeki büyümeyi baskılayıcı etkisi, SRB ve ATP canlılık analizleri değerlendirildi. SRB hücre canlılığı analizi sonucunda, UFE'nin doz bağımlı olarak HCT-15 ve HT-29 hücre soylarında hücre canlılığını azalttığı belirlendi ($p<0,05$). Doz yanıt eğrisine ve hücre ölüm parametrelerinden biri olan IC50 değerlerine göre HCT-15 hücre soyunun UFE uygulanmasına daha hassas olduğu gözlemlendi. IC50 değeri HTC-15 hücrelerinde $17,20 \mu\text{g/ml}$ iken HT-29 hücrelerinde $40,94 \mu\text{g/ml}$ olduğu bulundu.

SRB canlılık testi sonuçlarımızı doğrulamak amacıyla ATP canlılık yöntemi kullanıldı. ATP canlılık testi verilerimize göre UFE'nin 72 saatlik uygulamasının doza bağımlı olarak HCT-15 ve HT-29 hücre soylarında hücre canlılığını azalttığı belirlendi ($p<0,05$). IC50 değeri HCT-15 hücrelerinde $26,37 \mu\text{g/ml}$ iken HT-29 hücrelerinde $41,87 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplandı. ATP testiyle belirlenen IC50 değerleri SRB testiyle belirlenen

değerlere göre biraz yüksek olduğu gözlenmiştir. SRB canlılık testinde hücre canlılığı üzerine olan etki, hücresel protein miktarına göre belirlenirken, ATP testinde ise intraselüler ATP düzeylerine göre belirlenmektedir. Her iki canlılık testi de hücrelerdeki metabolik aktiviteyi göstermesine rağmen, elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olabilmektedir. Sonuçta UFE'nin hücreler üzerinde belli dozlarda büyümeyi baskılayıcı etkiye sahip olduğu açıktır. Nitekim daha önceki çalışmalarda, UFE'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri soyalarında IC50 değerleri 44,7 µg/ml ve 23,0 µg/ml (Kasimogullari ve ark. 2014); akciğer kanseri (A549 ve PC3), karaciğer kanseri (Hep3B) ve fare glioma (C6) hücrelerinde IC50 değerleri sırasıyla 37,0 µg/ml, 32,9 µg/m, 60,5 µg/ml ve 67,9 µg/ml (Ari ve ark. 2014) olarak belirlenmiştir. UFE'nin hücreler üzerinde bulunan bu büyümeyi baskılayıcı etkisi içerdiği sekonder metabolitlerinden kaynaklanabilir. *Usnea filipendula* salazinik asit, usnik asit, stiktik asit gibi sekonder metabolitler içermektedir (Oran ve ark. 2016, Purvis ve ark. 1994, Brodo ve ark. 2001). Yapılan analizlerde, salazinik asitin insan melanoma ve insan kolon kanser soylarında yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Manojlovic ve ark. 2012). Bir diğer sekonder metaboliti olan usnik asit üzerine pek çok çalışma bulunmaktadır. Usnik asidin insan melanoma (FemX) ve kolon kanser (LS174) hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Rankovic ve ark. 2012).

Usnik asit *Usnea* türlerinin belirgin metabolittir (Guo ve ark. 2008). Usnik asidin sitotoksik aktivitesi çeşitli kanser soyları üzerine çalışmış olup belirlenen IC50 değerleri: kolorektal kanser HT29 hücre için 32,7 µg/ml, mide kanser AGS hücre için 5,16 µg/ml, akciğer kanser A549 hücre için 22,46 µg/ml, ve prostat kanser CWR22Rv-1 hücre için 8,29 µg/ml, melanom UACC-62 hücre için 31,5 µg/ml, B16-F10 hücre için 47,7 µg/ml, ve insan glioblastoma U251 hücre için 6,77 µg/ml olarak belirtilmiştir (Nguyen ve ark. 2014, Brandao ve ark. 2013, Bazin ve ark. 2008). Kolon kanser HT29 hücre soyu üzerine yapılan çalışmada usnik asit büyük mitokondri membran bozukluğunu, kaspaz-3 aktivasyonu, ve apoptotik proteinler PARP, p53, Bcl-2 ve Bax ekrespresyonu indüklendiği gösterilmiştir (Backorova ve ark. 2012). Usnik asit uygulanan insan hepatoma HepG2 hücre soyunda kaspaz-3/7 aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Chen ve ark. 2014). İnsan akciğer karsinom A549 hücre soyunda usnik asit mitokondri membran depolarizasyon mekanizmasıyla apoptozisi indüklendiği gösterilmiştir (Singh ve ark. 2013).

Çalışmamızda HCT-15 ve HT-29 hücrelerinde belirlenen sitotoksik aktiviteden sorumlu hücre ölüm modunu (apoptoz/nekroz) belirlemek amacıyla apoptozis belirleyicisi olan kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) seviyesi araştırıldı. M30 seviyeleri incelendiğinde, UFE'nin 72 saatlik uygulanmasından (25, 50 ve 100 µg/ml) sonra HCT-15 hücrelerinde M30 seviyesinde uygulanan dozlarda kontrole oranla az bir değişim gözlemlendi. Fakat floresan boyalarla yapılan morfolojik incelemelerde hücrelerde piknotik nükleusların varlığının ve hem Annexin-V hem de PI pozitifliğinin gözlenmesi HCT-15 hücrelerinin UFE etkisiyle geç apoptozla öldüğü söylenebilir. HT-29 hücrelerinde ise UFE'nin 72 saatlik uygulanmasından (25, 50 ve 100 µg/ml) sonra M30 seviyesinde özellikle 25 µg/ml dozunda kontrole oranla yaklaşık 14 katlık artış bulundu. M30 artışı 50 µg/ml dozda 6 kat iken, 100 µg/ml dozunda 2 katlık artış belirlendi. İstatistiksel olarak da anlamlı bulunan bu artışlar UFE'nin HT-29 hücrelerinde bu dozlarda apoptozisi indükleyerek hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Nitekim HT-29 hücrelerinin floresan mikroskopik incelemesi sonucunda da hücrelerde piknotik nükleusların varlığı ve özellikle 24 saatlik 100 µg/ml UFE uygulamasından sonra Annexin-V pozitifliği hücrelerin apoptozis yoluyla öldüğünü desteklemektedir. *U. fasciata*, *U. subcavata*, *U. cavernosa*, *U. barbata*, *U. longgassima*, *U. ghattensis* gibi birkaç *Usnea* türlerinin çeşitli kanser hücre soyları üzerine sitotoksik, anti-büyüme, ve anti-tümör aktivitelerine sahip oldukları belirtilmiştir (Prateeksha ve ark. 2016).

Kaspaz-3 ve kaspaz-7 temel kesici kaspazlardır ve her ikisi de belirli ölüm-başlatıcı uyarılara bakmaksızın evrensel olarak apoptozis boyunca aktive edilmektedirler (Walsh ve ark. 2008). Mitokondriyal membran bütünlüğünün değişmesi, sitoplazmaya sitokrom c salınması ile apoptozisin uyarıldığını gösteren önemli parametrelerden biridir (Wen ve ark. 2013). 100 µg/ml UFE uygulanan HCT-15 hücrelerinde kaspaz-3/7 aktivitesiyle yüksek oranda apoptoz yüzdesinin belirlenmesi hücrelerin apoptozis mekanizmasına yöneldiğini desteklemektedir. HT-29 hücrelerinde yüksek bir oranda kaspaz-3/7 aktivitesi gözlenmesine rağmen hücre popülasyonlarının %10.45'i depolarize mitokondriye sahip olduğu belirlenmiştir. *Usnea barbata* ekstraktının tümör hücre soyları (B16 fare melanoma ve C6 fare glioma) üzerinde apoptozisi indükleyerek sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Zugic ve ark. 2016).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında *Usnea filipendula* Stirt. metanol ekstraktının insan kolon kanseri hücrelerinde (HCT-15 ve HT-29) apoptozisi (erken ve geç apoptoz)

uyararak sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir. Bu tez verilerinden yola çıkarak *Usnea filipendula* türünün anti kanser aktiviteye sahip olduğu ve kullanılan ekstraktın içerik analizinin yapılarak bu aktiviteden sorumlu etken madde yada maddelerin belirlenmesi ve sitotoksik aktivitenin daha net ortaya konması için ileri in vivo ve in vitro analizlere gereksinim duyulduğu sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G., Gleiberman, I., Caruso, P.A., Ricks, S.H., Untch, M., Sartori, C., Bruckner, H.W., 1995. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian cancer. *Cancer Res.*, 55: 5276-5782.

Anonim, 2009. Images of British Lichens: *Usnea filipendula* Stirt. http://www.lichens.lastdragon.org/Usnea_filipendula.html (Erişim tarihi: 29.04.2016).

Anonim, 2016a. Cancer Fact sheets. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Erişim Tarihi: 29.04.2016).

Anonim, 2016b. Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı 2006-2008 yılları Türkiye Kanseri İnsidansı, [www.kanser.gov.tr. http://kanser.gov.tr/Dosya/tarama/kolorektal_kanser_tarama_programi.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/tarama/kolorektal_kanser_tarama_programi.pdf) (Erişim tarihi: 24.04.2016).

Anonim, 2016c. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts and Figures Special Edition 2005. Atlanta: American Cancer Society, 2005 (Erişim tarihi: 24.04.2016).

Anonim, 2016d. Türkiye Kanseri İstatistikleri. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Rapor 2016.

Anonim, 2016e. Chemotherapy for colorectal cancer. <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-treating-chemotherapy> (Erişim Tarihi: 29.04.2016).

Anonim, 2016f. Kolorektal Kanseri Taramaları (Değerlendirme Raporları). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanseri Daire Başkanlığı. http://kanser.gov.tr/dosya/tarama/kolorektal_kanser_tarama_programi.pdf (Erişim tarihi: 20.03.2016).

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., Juliano, R.L. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.*, 50: 197-263.

Ari, F., Aztopal, N., Oran, S., Bozdemir, S., Celikler, S., Ozturk, S., Ulukaya, E. 2014. *Parmelia sulcata* Taylor and *Usnea filipendula* Stirt induce apoptosis-like cell death and DNA damage in cancer cells. *Cell Prolif.*, 47: 457-464.

Aslan, A., Yazıcı, K., Karagöz, Y. 2002. Lichen flora of the Murgul district, Artvin, Turkey. *Israel J. Plant Scie.*, 50(1): 77-81.

Backorova, M., Jendzelovsky, R., Kello, M., Backor, M., Mikes, J., Fedorocko, P. 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro*, 26(3): 462-468.

- Balarinová, K., Váczi, P., Barták, M., Hazdrová, J., and Forbelská, M. 2013.** Temperature-dependent growth rate and photosynthetic performance of Antarctic symbiotic alga *Trebouxia* sp. cultivated in a bioreactor. *Czech Polar Rep.*, 3: 19-27.
- Bazin, M., Le Lamer, A., Delcros, J., Rouaud, Í., Uriac, P., Boustie, J., Corbel, J., Tomasi, S. 2008.** Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 16(14): 6860-6866.
- Bendas, G., Borsig, L. 2012.** Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *Int. J. Cell Biol.*, 2012: 676-731.
- Bhanot, A., Sharma, N. 2011.** Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *Int. J. Phytomed.*, 3: 09-26.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Fridman, WH., Pages, F., and Galon, J. 2010.** Natural immunity to cancer in humans. *Curr. Opin. Immunol.*, 22(2): 215-222.
- Blackburn, E. 2005.** Telomerase and Cancer. *Mol. Cancer Res.*, 3(9): 477-482.
- Boustie, J., Grube, M. 2005.** Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genet. Resour.*, 3: 273-287.
- Brandao, L.F., Alcantara, G.B., Matos, F.M., Bogo, D., Freitas, D.S., Oyama, N.M., Honda, N.K. 2013.** Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from Lichens against melanoma cells. *Chem. Pharm. Bull.* 61(2): 176-183.
- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D., Sharnoff, S. 2001.** Lichens of North America. 1st ed. New Haven, USA: Yale University Press.
- Bryan, T.M., Cech, T.R. 1999.** Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11(3): 318-324.
- Burger, F., Fiebig, H., Rudek, M.A. et al. (eds.). 2014.** Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Cancer Drug Discovery and Development. Springer Science+Business Media New York, USA, 836 pp.
- Cansaran, D., Kahya, D., Yurdakulol, E., Atakol, O. 2006.** Identification and Quantitation of Usnic Acid from the Lichen *Usnea* Species of Anatolia and Antimicrobial Activity. *Z. Naturforsch. C.*, 61(11-12): 773-776.
- Chau, I., Cunningham, D. 2006.** Adjuvant therapy in colon cancer- what, when and how. *Ann. Oncol.*, 17(19): 1347-1359.
- Chen, S., Dobrovolsky, V., Liu, F., Wu, Y., Zhang, Z., Mei, N., Guo, L. 2014.** The Role of Autophagy in Usnic Acid-Induced Toxicity in Hepatic Cells. *Toxicol. Sci.*, 142(1): 33-44.

- Christofori, G., Semb, H. 1999.** The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.*, 24: 73-76.
- Clerc, P. 1992.** Some new or interesting species of the genus *Usnea* (lichenised Ascomycetes) in the British Isles. *Candollea*, 47: 513-526.
- Clerc, P. 1998.** Species concepts in the genus *Usnea* (lichenized Ascomycetes). *The Lichenologist*, 30(4-5): 321-340.
- Clerc, P. 2006.** Synopsis of *Usnea* (lichenized Ascomycetes) from the Azores with additional information on the species in Macaronesia. *The Lichenologist*, 38(03): 191-212.
- Clerc, P., Herrera-Campos, M.A. 1997.** Saxicolous species of *Usnea* subgenus *Usnea* (lichenized ascomycetes) in North America. *Bryologist*, 100(3): 281-301.
- Çobanoğlu, G. 2015.** The use of lichens for biomonitoring of atmospheric pollution. *Sigma J. Eng. & Nat. Sci.*, 33(4): 591-613.
- Çobanoğlu, G., Akdemir, B. 2004.** Contribution to the lichen diversity of Nature Parks in Bolu and Çorum, Anatolia, Turkey. *Herzogia*, 17: 129-136.
- Cocchietto, M., Skerton, N., Nimis, P.L., and Sava, G. 2002.** A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89(4): 137-146.
- Conradt, B., Horvitz, H.R. 1998.** The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 93(4): 519-529.
- Correche, E.R., Carrasco, M., Giannini, F., Piovano, M., Garbarino, J., Enriz, D. 2002.** Cytotoxic screening activity of secondary lichen metabolites. *Acta. Farm. Bon.*, 21(4): 273-278.
- Correche, E.R., Enriz, R.D., Piovano, M., Garbarino, J., Gomez- Lechon, M.J. 2004.** Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. *Altern. Lab Anim.*, 32(6): 605-615.
- Cory, S., Adams, J.M. 2002.** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2(9): 647-56.
- Cragg, G.M. 1998.** Paclitaxel (Taxol): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Med. Res. Rev.*, 18: 315-331.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., Thompson, C.B. 2008.** The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.*, 7(1): 11-20.

Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53): 8543-8567.

Demain, A., Vaishnav, P. 2011. Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotech.*, 4(6): 687-699.

Denault, J.B., Salvesen, G.S. 2002. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.*, 102(12): 4489-500.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 383-424.

Ethell, D.W., Buhler, L.A. 2003. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J. Clin. Immunol.*, 23(6): 439-46.

Fedi, P., Tronick, SR., and Aaronson, SA. 1997. Growth factors. In *Cancer Medicine*, Ed.: J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, Baltimore, MD: Williams and Wilkins, pp. 41–64.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, DM., Forman, D., Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. <http://globocan.iarc.fr>, (Erişim tarihi: 07/04/2016).

Ferrone, C., Dranoff, G. 2010. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J. Clin. Oncol.*, 28: 4045-4051.

Feuerer, T., Hawksworth, D. 2007. Biodiversity of lichens, including a worldwide analysis of checklist data based on Takhtajan floristic regions. *Biodivers. Conserv.*, 16(1): 85-98.

Friedl, T., Budel, B. 2008. Photobionts in Lichen Biology, Ed: T. H. Nash III, Cambridge University Press, New York, USA, pp. 9-26.

Gewies, A. 2003. Introduction to Apoptosis. ApoReview. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf> (Erişim tarihi: 29.04.2016).

Ghione, M., Parrello, D., Grasso, L. 1988. Usnic acid revisited, its activity on oral flora. *Chemioterapia*, 7: 302–305.

Giancotti, F.G., Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science*, 285: 1028-1032.

Güleş, Ö., Eren Ü. 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2: 73-78.

Guo, L., Shi, Q., Fang, J.L., Mei, N., Ali, A.A., Lewis, S.M., Leakey, J.E., Frankos,

V. H. 2008. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 26(4): 317-338.

Halıcı, M.G., Aksoy, A., Kocakaya, M. 2007. Some Lichens from Gaziantep, Kahramanmaraş, Kırşehir and Yozgat Provinces (Turkey). *Turk. J. Bot.*, 31: 161-170.

Hanahan, D., Weinberg, R. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70.

Hanahan, D., Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.

He, Y., Zhang, Z. 2012. Diversity of organism in the *Usnea longissima* lichen. *African Microbiol. Res.*, 6(22): 4797-4804.

Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805): 770-776.

Hicklin, D., Ellis, L. 2005. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J. Clin. Oncol.*, 23: 1011-1027.

Hidalgo, M.E., Fernández, E., Quilhot, W., Lissi, E. 1994. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*, 37(6): 1585-1587.

Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., Pannet, H., Shneyvays, V., Shainberg, A., Goldshtaub, V., Tobar, A., Vidne, BA. 2003. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284(6): 2351-2359.

Hongmei, Z. 2012. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review, Apoptosis and Medicine, Ed: Dr. Tobias Ntuli, InTech, pp: 3-22.

Hsu, P.P., Sabatini, D.M. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5): 703-707.

Huneck, S. 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86(12): 559-570.

Ingolfssdottir, K. 2002. Usnic acid. *Phytochemistry*, 61: 729-736.

Jeanes, A., Gottardi, C.J., Yap, A.S. 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 27: 6920-6929.

Jones, R.G., Thompson, C.B. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.*, 23(5): 537-548.

Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A.A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M.G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R., Farber, E. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int. J. Oncol.*, 21(1): 165-170.

Kanno, T., Fujita, H., Muranka, S., Yano, H., Utsumi, T., Yoshioka, T., Inoue, M., Utsumi, K. 2002. Mitochondrial swelling and cytochrome c release: sensitivity to cyclosporin A and calcium. *Physiol. Chem. Phys. Med NMR.*, 34(2): 91-102.

Kantheti, P., Igoli, J.O., Gray, A.I., Clements, C.J., Singla, R.K. 2012. Parmeliaceae- An Important Family of Lichens with Medicinal Importance. *Webmed Cent. Pharmaceut. Scien.*, 3(11): WMC003807.

Kasimogullari, S., Oran, S., Ari, F., Ulukaya, E., Aztopal, N., Sarimahmut, M., Ozturk S. 2014. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. in vitro. *Turk. J. Biol.*, 38: 940-947.

Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73(8): 2013-2026.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4): 239-257.

Kinoshita, K., Saito, D., Koyama, K., Takahashi, K., Sato, Y., Okuyama, E., Fujimoto, H., Yamazaki, M. 2002. Monoamino oxidase inhibitory effects of some lichen compounds and their synthetic analogues. *J. Hatt. Bot. Lab.*, 92: 277-284.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalper, J.A. 2008. Dictionary of the fungi, 10th ed. CAB International, Wallingford, UK, 72 pp.

Koonin, E.V., Aravind, L. 2002. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ.*, 9(4): 394-404.

Kroemer, G., Reed, J.C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 6(5): 513-519.

Kunjachan, S., Rychlik, B., Storm, G., Kiessling, F., Lammers T. 2013. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(0): 1852-1865.

Lamkanfi, M. 2011. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(3): 213-220.

Larsson, S.C., Wolk, A. 2006. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Cancer*, 119(11): 2657-2664.

Lawen, A. 2008. Apoptosis-an introduction. *BioEssays*, 25(9): 888-896.

Lebman, D., Edmiston, J. 1999. The Role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect.*, 1(15): 1297-304.

Lee, K.H. 1999. Novel antitumour agents from higher plants. *Med. Res. Rev.*, 19: 569-

Leers, M.P., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B. 1999. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.*, 187: 567-72.

Legaz, M.E., Vicente, C., Pedrosa, M.M. 2001. Binding of lichen phenolics to purified secreted arginase from the lichen *Evernia prunastri*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 34: 194-200.

Leist, M., Jaattela, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(8): 589-98.

Li, J., Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27: 6194-6206.

Logue, S.E., Gorman, A.M., Cleary, P., Keogh, N., Samali, A. 2013. Current Concepts in ER stress-induced Apoptosis. *J. Carcinogene Mutagene*, S6: 002.

Longnecker, M.P., Orza, M.J., Adams, M.E. 1990. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. *Cancer Causes Cont.*, 1(1): 59-68.

Lukashev, M.E., Werb, Z. 1998. ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.*, 8: 437-441.

Luo, H., Zhang, Y., Zhang Z., Jin, Y. 2012. The protection of MSCs from apoptosis in nerve regeneration by TGFβ1 through reducing inflammation and promoting VEGF-dependent angiogenesis. *Biomaterials*, 33(17): 4277-4287.

Malhotra, S., Subban, R., Singh, A. 2007. Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. *The Internet J. of Alter. Med.*, 5(2).

Mann, J. 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present, and future. *Nat. Rev. Cancer*, 2(2): 143-148.

Manojlovic, N., Rankovic, B., Kosanic, M., Vasiljevic, P., Stanojkovic, T. 2012. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomed.*, 19(13): 1166-1172.

Matsubara, H., Mihar, K., Kinoshita, K., Koyama, K., Ye, Y., Takahashi, K., Yoshimura, I., Yamamoto, Y., Miura, Y., Kinoshita, Y. 1998. Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells. *Nat. Pro. Sci.*, 4: 161-169.

Mayer, M., O'Neill, M.A., Murray, K.E., Santos-Magalhaes, N.S., Carneiro-Leao, A.M., Thompson, A.M., Appleyard, V.C. 2005. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-cancer Drugs*, 16(8): 805-809.

Meier, P., Finch, A., Evan, G. 2000. Apoptosis in development. *Nature*, 407(6805): 796-801.

Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Tosic, S., Stankovic, M., Radojevic, I et al. 2011a. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 5428-5448.

Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Nikolic, M., Tosic, S., Stojicic, D. 2011b. Lichens as source of versatile bioactive compounds. *Biologica Nyssana*, 2(1): 1-6.

Molnar, K., Farkas, E. 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z. Naturforsch. C.*, 65: 157-173.

Mueller, M.M., Fusenig, N.E. 2004. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 839-849.

Mund, T., Gewies, A., Schoenfeld, N., Bauer, M.K. and Grimm, S. 2003. Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *Faseb J.*, 17(6): 696-8.

Neamati, N., Hong, H., Mazumder, A., Wang, S., Sunder, S., Nicklaus, M.C., Milne, GWA., Proksa, B., Pommier, Y. 1997. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *J. Med. Chem.*, 40(6): 942-951.

Nelson, B.H. 2008. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol. Rev.*, 222: 101-116.

Nguyen, T.T., Yoon, S., Yang, Y., Lee, H.B., Oh, S., Jeong, M.H., Kim, J.J., Yee, S.T., Crisan, F., Moon, C., Lee, K.Y., Kim, K.K., Hur, J.S., Kim, H. 2014. Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PloS One*, 9(10): e111575.

Ohmura, Y. 2002. Phylogenetic evaluation of infrageneric groups of the genus *Usnea* based on ITS regions in rDNA. *J. of Hattori Bot. Lab.*, 92: 231-243.

Oksanen, I. 2006. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73(4): 723-734.

Olafsdottir, E.S., Ingolfssdottir, K. 2001. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Med.*, 67(3): 199-208.

Oran, S. 2011. Epiphytic lichen diversity on *Fagus orientalis* Lipsky and *Fagus sylvatica* L. in the Marmara region (Turkey). *Biol. Diver. and Conserv.*, 4(1): 134-143.

- Oran, S., Öztürk, Ş. 2012.** Epiphytic lichen diversity on *Quercus cerris* and *Q. frainetto* in the Marmara region (Turkey). *Turk. J. Bot.*, 36: 175-190.
- Oran, S., Sahin, S., Sahinturk, P., Ozturk, S., Demir, C. 2016.** HPLC analysis of stictic and usnic acids of three *Usnea* species. *Iranian J. of Pharmaceut. Res.*, 15. Available online 06 March 2016. Article in press. (Erişim tarihi: 28.03.2016).
- Oran, S., Uğur, A., Özturk, S. 2007.** Some Lichen Records From *Quercus vulcanica* Forests Around Yukarı Gökdere (Isparta, Turkey). *J. Biol. Environ. Sci.*, 1(3): 121-126.
- Öztürk, Ş., Güvenç, Ş. 2010.** The distribution of epiphytic lichens on Uludag fir (*Abies nordmanniana* (Steven) Spach subsp. *bornmuelleriana* (Mattf.) Coode & Cullen) forests along an altitudinal gradient (Mt. Uludag, Bursa, Turkey). *Ekoloji*, 19(74): 131-138.
- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartous, E., Sautes-Fridman, C. Fridman, W.H. 2010.** Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8): 1093-1102.
- Portera, A.G., Janicke, R.U. 1999.** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, 6(2): 99-104.
- Prakash, O., Kumar, A., Kumar, P. 2013.** Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *Am. J. Pharmacol. Sci.*, 1(6): 104-115.
- Prateeksha, B., Paliya, S., Jadaun, V., Kumar, J., Kumar, S., Upreti, D.K., Singh B.R., Nayaka, S., Joshi, Y., Singh, B. 2016.** The genus *Usnea*: a potent phytomedicine with multifarious ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *RSC Advances*, 6: 21672-96.
- Punt, C.J., Tol, J. 2009.** More is less—combining targeted therapies in metastatic colorectal cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 6: 731-733.
- Purvis, O.W., Coppins, B.J., Hawskworth, D.L., James, P.W., Moore, D.M. 1994.** The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. 2nd ed. London, UK: Natural History Museum Publications in association with The British Lichen Society.
- Rafat, A., Ridgway, H., Cruickshank, R., Buckley, H. 2014.** Isolation and co-culturing of symbionts in the genus *Usnea*. *Symbiosis*, 66(3): 123-132.
- Randlane, T., TõRra, T., Saag, A., and Saag, L. 2009.** Key to European *Usnea* species. *Bibliotheca Lichenologica*, 100: 419-462.
- Rankovic, B., Kosanic, M., Stanojkovic, T., Vasiljevic, P., Manojlovic, N. 2012.** Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(11): 14707-14722.
- Russo, T., Terrasi, M., Agnese, V., Santini, D., Bazan, V. 2006.** Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Ann. Oncol.*, 17 (Supplement 7): vii115-vii123.

- Saraste, A and Pulkki, K. 2000.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.*, 45(3): 528-537.
- Sartorius, U., Schmitz, I. and Krammer, PH. 2001.** Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.*, 2(1): 20-29.
- Schwartsmann, G. 2000.** Marine organisms and other novel natural sources of new cancer drugs. *Ann. Oncol.*, 11: 235-243.
- Scirpa, P., Scambia, G., Masciullo, V., Battaglia, F., Foti, E., Lopez, R., et al. 1999.** A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by human papillomavirus. *Minerva Ginecol.*, 51(6): 255-60.
- Shimizu, N., Nagata, C., Shimizu, H. 2003.** Height, weight, and alcohol consumption in relation to the risk of colorectal cancer in Japan: a prospective study. *Br. J. Cancer*, 88(7): 1038-1043.
- Shukla, V., Pant J.G., Rawat M.S.M. 2010.** Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochem. Rev.*, 9: 303-314.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. 2013.** Cancer statistics, CA. *Cancer J. Clin.*, 63: 11-30.
- Singh, N., Nambiar, D., Kale, R., Singh, R. 2013.** Usnic Acid Inhibits Growth and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma A549 Cells. *Nutr. Cancer*, 65: 36-43.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. 2000.** Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 217-45.
- Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. 2008.** Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.*, 84(4): 988-993.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. 1998.** Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381): 1312-1316.
- Timotius, K.H., Sari, İ.N., Santoso, A.W. 2015.** Major Bioactive Compounds of Pilis Plant Materials: A GC-MS Analysis. *Pharmacognosy Comm.*, 5(3): 190-196.
- Tore, B., Öztürk S. 2009.** Taxonomic Investigations on the Epiphytic Lichens on *Quercus* sp. of Uludag (Bursa – Turkey). *J. Biol. Environ. Sci.*, 3(7): 17-24.
- Tsong, W.H., Koh, W.P., Yuan, J.M., Wang, R., Sun, C.L., Yu, M.C. 2007.** Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Br. J. Cancer*, 96(5): 821-827.

Ueno, T., Toi, M., Bivén, K., Bando, H., Ogawa, T., Linder, S. 2003. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 39: 769-74.

Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochem. Func.*, 29: 468-480.

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A.Y., Demirci, M. 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 232-9.

Van Cruchten, S. and Van Den Broeck, W. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.*, 31(4): 214-223.

Van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C.P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1): 1-9.

Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, J.M. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189): 440-42.

Veikkola, T., Alitalo, K. 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 9: 211-220.

Verpoorte, R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov. Today*, 3: 232-238.

Vuorelaa, P., Leinonenb, M., Saikkuc, P., Tammela, P., Rauhad, J.P., Wennberge, T., Vuorela, H. 2004. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr. Med. Chem.*, 11: 1375-1389.

Walsh, J.G., Cullen, S.P., Sheridan, C., Luthi, A.U., Gerner, C., Mantin, S.J. 2008. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(35): 12815-19.

Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 15(22): 2922-2933.

Wei, E.K., Giovannucci, E., Wu, K. 2004. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int. J. Cancer*, 108(3): 433-442.

Wen, S., Zhu, D., Huang, P. 2013. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Med. Chem.*, 5(1): 53-67.

Wendrenmaire, M., Bardou, M., Peyronel, C. 2011. Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced myometrial apoptosis in an in vitro human model of chorioamnionitis. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 205(4): 363.e1-363.e9.

Wirtz N, Printzen, L., Sancho, G., Lumbsch, T. 2006. The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) revisited. *Taxon*, 55: 367-376.

Worth, A., Thrasher, A.J., Gaspar, H.B. 2006. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br. J. Haematol.*, 133(2): 124-40.

Yazıcı, K., Aptroot, A., Etayo, J., Aslan, A., Guttova, A. 2008. Lichens from the Batman, Mardin, Osmaniye, and Sivas regions of Turkey. *Mycotaxon*, 103: 141-144.

Yazıcı, K., Aslan, A. 2006. Lichen taxonomic composition from MustafaKemalpaşa, Bursa district (Turkey). *Acta Bot. Croat.*, 65(1): 25-39.

Yılmaz, Y., Türk, A.O., Böcük, H. 2015. Epiphytic lichen diversity of the Sündiken Mountains (Eskişehir, Turkey). *Herzogia*, 28(2): 753-761.

Zambare, V., Christopher, L. 2012. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharm. Biol.*, 50(6): 778-798.

Zheng, J. 2012. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol. Lett.*, 4(6): 1151-1157.

Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.*, 92(1): 57-70.

Zugic, A., Jeremic, I., Isakovic, A., Arsic, I., Savic, S., Tadic, V. 2016. Evaluation of Anticancer and Antioxidant Activity of a Commercially Available CO₂ Supercritical Extract of Old Man's Beard (*Usnea barbata*). *PLoS ONE*, 11(1): e0146342.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Cyrollah DISOMA

Doğum Yeri ve Tarihi: Filipinler, 05 Nisan 1993

Yabancı Dil: İngilizce ve Türkçe

Eğitim Kurumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Dansalan College Foundation Inc. (2005-2009)

Lisans: Mindanao State University, Fen Edebiyat ve Matematik Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Ana Bilim Dalı (2009-2013; *Cum Laude*)

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü (2014-2016)

İletişim (e-posta): cydisoma@yahoo.com