

**LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİNİN
DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ ÜZERİNE POTANSİYEL
ETKİLERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Buğrahan EMSEN

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

Prof. Dr. Ali ASLAN

Haziran - 2015

**T.C.
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİNİN
DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ ÜZERİNE POTANSİYEL
ETKİLERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Buğrahan EMSEN

Anabilim Dalı: BİYOLOJİ

Programı: BOTANİK

Tez Danıőmanı: Prof. Dr. Ali ASLAN

KARAMAN-2015

TEZ ONAYI

Buğrahan EMSEN tarafından hazırlanan “**Liken Sekonder Metabolitlerinin Deneysel Beyin Tümör Modeli Üzerine Potansiyel Etkilerinin *In Vitro* Yöntemlerle Araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ali ASLAN

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Güleray AĞAR
Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU
Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hasan GÜRBÜZ
Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi
OFMAE Bölümü Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı

Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ
Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Tez Savunma Tarihi: 05.06.2015

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



Buğrahan EMSEN

ÖZET

Doktora Tezi

LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİNİN DENEYSSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ ÜZERİNE POTANSİYEL ETKİLERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Buğrahan EMSEN

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali ASLAN

Haziran, 2015, 138 sayfa

Beyin kanser türleri içerisinde en sık karşılaşılan ve en tehlikeli malign seyir gösteren glioblastoma multiforme ile tedavi sürecinde yararlanılan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin kifayetsiz kalması ve yan etkilerinin fazla boyutta olması bitkisel kaynaklı ürünlerin tedavi sürecinde kullanılmasını ön plana çıkarmıştır. Tez çalışması kapsamında, doğada yalnızca likenlere has olan liken sekonder metabolitlerden difraktaik asit (DA), fisodik asit (FA), lobarik asit (LA), olivetorik asit (OA), psoromik asit (PA) ve usnik asit (UA)'in farklı konsantrasyonlarının insan U87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki antitümörojenik aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, primer sıçan serebral korteks (PSSK) hücreleri üzerinde de araştırmalar gerçekleştirilmek suretiyle, liken sekonder metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak sağlıklı ve kanserli beyin hücreleri üzerindeki etkileri ortaya çıkarılmıştır. Test edilen metabolitlerin sitotoksik etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) analizleri ile tespit edilmiştir. Hücre kültürlerinde oksidatif etkilerin değerlendirilmesinde toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) parametreleri kullanılmıştır. Aynı zamanda, liken sekonder metabolitlerinin sağlıklı ve kanserli beyin hücreleri üzerindeki oksidatif DNA hasar düzeyleri, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG) seviyeleri değerlendirilerek incelenmiştir. Hesaplanan medyan inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) değerlerine göre, PSSK hücreleri için metabolitlerin sıralaması LA < PA < DA < OA < UA < FA şeklinde, U87MG hücreleri için LA < OA < DA < UA < PA < FA şeklinde olmuştur. Metabolitlerin sitotoksik etkilerinin konsantrasyon, LDH aktivite ve oksidatif DNA hasarı ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular, yan etkiler de göz önüne alındığında, glioblastoma multiforme tedavisinde başta OA olmak üzere DA ve UA'nın yüksek derecede kullanım potansiyeline sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma multiforme, U87MG, Sitotoksiste, Genotoksiste, Oksidatif durum, Liken, Sekonder metabolit, *In vitro*

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF POTENTIAL EFFECTS OF LICHEN SECONDARY METABOLITES ON EXPERIMENTAL BRAIN TUMOR MODEL WITH *IN VITRO* METHODS

Buğrahan EMSEN

Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ali ASLAN

June, 2015, 138 pages

Since surgery, radiotherapy and chemotherapy methods utilized in treatment process with glioblastoma multiforme which is most common and shows the most dangerous malignant course in brain cancer types are inadequate and have too many side effects, the usage of herbal products in the treatment process come into prominence. In this thesis, antitumorigenic activity potentials of different concentrations of diffractaic acid (DA), physodic acid (FA), lobaric acid (LA), olivetoric acid (OA), psoromic acid (PA) and usnic acid (UA) from lichen secondary metabolites which only found in lichens in the nature on human U87MG glioblastoma cells were investigated. In addition, comparative effects of lichen secondary metabolites on healthy and cancerous brain cells were revealed performing the researches on primary rat cerebral cortex (PRCC) cells. Cytotoxic effects of tested metabolites were determined via 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) analyses. Total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant status (TOS) parameters were used for evaluation of oxidative effects in the cell cultures. At the same time, oxidative DNA damage levels of lichen secondary metabolites on healthy and cancerous brain cells were investigated by evaluating 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) levels. According to the calculated median inhibitory concentration (IC₅₀) values, secondary metabolites were in the ascending order of LA < PA < DA < OA < UA < FA for PRCC cells and LA < OA < DA < UA < PA < FA for U87MG cells. It was determined that the cytotoxic effects of the metabolites show positive correlation with concentration, LDH activity and oxidative DNA damage. The findings obtained in this study revealed that when the side effects are also taken into consideration, primarily OA and then DA and UA have high potential for use in the treatment of glioblastoma multiforme.

Keywords: Glioblastoma multiforme, U87MG, Cytotoxicity, Genotoxicity, Oxidative status, Lichen, Secondary metabolites, *In vitro*

ÖN SÖZ

Bu çalışma Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından desteklenen 01-D-13 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Doktora öğrenimim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen ve bilimsel çalışmalarında beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Ali ASLAN'a (Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi); araştırmalarımın her aşamasında değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yardım ve alakasını eksik etmeyen Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e (Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi); laboratuvar imkânlarından faydalandığım Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na (Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi); çalışmalarım sırasında sağladığı her türlü imkân ve destekten dolayı Rektör Yardımcımız ve Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ'a (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi); tez projemde yönetici olarak desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Abdullah KAYA'ya (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi); çalışmalarım esnasında özverili yardımlarını esirgemeyen başta Sayın Dr. Başak TOĞAR (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi) olmak üzere, Sayın Ali TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ'ye (Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi), Sayın Arş. Gör. Kemal Alp NALCI'ya (Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi) ve Sayın Maryam MOHAMMADZADEH'e (Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi); tez jürimde yer alarak bizleri onurlandıran Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi), Sayın Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU'na (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi) ve Sayın Prof. Dr. Hasan GÜRBÜZ'e (Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi); doktora öğrenimim sırasında 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı aracılığı ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve son olarak, hayatımın her döneminde yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme

Teşekkürlerimi arz ederim.

Buğrahan EMSEN

Haziran, 2015

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Kuramsal Temeller	6
2.1.1. Kanserin Genetik Yolakları	6
2.1.2. Hücre Döngüsü ve Kansere İlişkisi	8
2.1.3. Metastaz Süreci.....	11
2.1.4. Tümör Çeşitleri	13
2.1.5. Glioblastoma Multiforme	16
2.1.6. Kansere Tedavi Yöntemleri.....	19
2.1.6.1. Cerrahi Tedavi	20
2.1.6.2. Radyoterapi.....	20
2.1.6.3. Kemoterapi.....	21
2.1.6.4. Hormonal Tedavi	22
2.1.6.5. İmmünoterapi.....	22
2.1.6.6. Ağrı Tedavisi	23
2.1.6.7. Tamamlayıcı ve Alternatif Tedaviler.....	24
2.1.7. Alternatif Tedavi Amaçlı Kullanılan Likenlerin Genel Özellikleri.....	25
2.2. Kaynak Araştırması	27
3. MATERYAL VE METOT	45
3.1. Materyal	45
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri ve Cihazlar	46

3.1.3. Likenler	47
3.1.4. Deney Hayvanları ve Hücre Kùltürleri	48
3.1.5. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	48
3.1.5.1. PSSK Hücre Kùltürü Medyumu	48
3.1.5.2. U87MG Glioblastoma Hücre Kùltürü Medyumu	48
3.1.5.3. Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	48
3.1.5.4. Hank Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS)	49
3.1.5.5. Sekonder Metabolit Çözeltileri	49
3.2. Metot	50
3.2.1. Ekstraksiyon	50
3.2.2. Ekstraktlar Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar	51
3.2.3. PSSK Hücre Kùltürünün Hazırlanması	56
3.2.4. U87MG Glioblastoma Hücre Kùltürünün Hazırlanması	59
3.2.4.1. Stoktan Çıkarılan Donmuş Hücrelerin Kùltürü	59
3.2.4.2. Hücrelerin Pasajlanması	60
3.2.4.3. Hücreleri Stoklama	60
3.2.4.4. Hücrelerin Mikroskopta Sayılması	61
3.2.5. Sitotoksisite Analizleri	62
3.2.5.1. MTT Analizi	62
3.2.5.2. LDH Salınımı Analizi	64
3.2.6. Biyokimyasal Analizler	66
3.2.6.1. TAK Analizi	66
3.2.6.2. TOD Analizi	68
3.2.7. Oksidatif DNA Hasar Analizi	70
3.2.8. Verilerin Analizi	73
4. BULGULAR	74
4.1. Sitotoksisite Analizleri	74
4.1.1. MTT Analizi ile Hücrelerde Canlılık Oranının Test Edilmesi	74
4.1.2. LDH Salınımı Analizi ile Metabolitlerin Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	77
4.2. Biyokimyasal Analizler	80

4.2.1. Metabolitlerin <i>In Vitro</i> Koşullarda Oluşturduğu TAK Düzeylerinin Belirlenmesi	80
4.2.2. Metabolitlerin <i>In Vitro</i> Koşullarda Oluşturduğu TOD Düzeylerinin Belirlenmesi	83
4.3. Metabolitlerin Hücreler Üzerinde Sebep Oldukları Oksidatif DNA Hasar Düzeylerinin Belirlenmesi	86
4.4. Hücreler Üzerinde Gerçekleştirilen Uygulamalar Sonucunda Değişkenler Arasındaki Korelasyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	89
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	96
KAYNAKLAR	106
ÖZ GEÇMİŞ	133

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Tümör çeşitleri.....	15
Çizelge 3.1 : Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar	45
Çizelge 3.2 : Deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler ve cihazlar	46
Çizelge 3.3 : FA'nın ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektral verileri	54
Çizelge 3.4 : OA'nın ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektral verileri	55
Çizelge 3.5 : PA'nın ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektral verileri	56
Çizelge 4.1 : Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen PSSK hücreleri için tespit edilen IC ₅₀ değerleri	76
Çizelge 4.2 : Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen U87MG hücreleri için tespit edilen IC ₅₀ değerleri	76
Çizelge 4.3 : PSSK hücreleri üzerinde DA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	90
Çizelge 4.4 : U87MG hücreleri üzerinde DA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	90
Çizelge 4.5 : PSSK hücreleri üzerinde FA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	91
Çizelge 4.6 : U87MG hücreleri üzerinde FA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	91
Çizelge 4.7 : PSSK hücreleri üzerinde LA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	92
Çizelge 4.8 : U87MG hücreleri üzerinde LA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	92
Çizelge 4.9 : PSSK hücreleri üzerinde OA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	93
Çizelge 4.10 : U87MG hücreleri üzerinde OA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	93

Çizelge 4.11: PSSK hücreleri üzerinde PA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	94
Çizelge 4.12: U87MG hücreleri üzerinde PA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	94
Çizelge 4.13: PSSK hücreleri üzerinde UA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	95
Çizelge 4.14: U87MG hücreleri üzerinde UA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Kanser genleri ve fonksiyonları.....	7
Şekil 2.2 : Hücre döngüsü basamakları.....	9
Şekil 2.3 : Metastaz basamakları.....	13
Şekil 3.1 : Sekonder metabolit eldesinde yararlanılan liken türleri	47
Şekil 3.2 : Ekstraksiyon işleminin yapıldığı Soxhlet ekstraktörü ve kurulan düzenek	50
Şekil 3.3 : Ekstraktların yoğunlaştırıldığı döner buharlaştırıcı	51
Şekil 3.4 : Deneysel çalışmalarda kullanılan liken sekonder metabolitlerinin kimyasal yapıları.....	53
Şekil 3.5 : PSSK hücre kültürü hazırlama basamakları	58
Şekil 3.6 : U87MG hücrelerinin plakaya aktarılarak hücre kültürünün sonlandırılması.....	59
Şekil 3.7 : MTT analizi sonucu plaka görünümü.....	64
Şekil 3.8 : LDH analizi sonucu plaka görünümü	66
Şekil 3.9 : TAK analizi sonucu plaka görünümü	68
Şekil 3.10: TOD analizi sonucu plaka görünümü	70
Şekil 3.11: Oksidatif DNA hasar analizi sonucu plaka görünümü	73
Şekil 4.1 : Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen PSSK hücrelerinde MTT analizi sonucu elde edilen canlılık oranları.....	75
Şekil 4.2 : Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen U87MG hücrelerinde MTT analizi sonucu elde edilen canlılık oranları.....	75
Şekil 4.3 : Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen PSSK hücrelerinde gözlenen LDH salınım seviyesi	78
Şekil 4.4 : Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen U87MG hücrelerinde gözlenen LDH salınım seviyesi	79

Şekil 4.5 : PSSK hücreleri üzerinde test edilen farklı liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu TAK düzeyleri.....	81
Şekil 4.6 : U87MG hücreleri üzerinde test edilen farklı liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu TAK düzeyleri.....	82
Şekil 4.7 : PSSK hücreleri üzerinde test edilen farklı liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu TOD düzeyleri.....	84
Şekil 4.8 : U87MG hücreleri üzerinde test edilen farklı liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu TOD düzeyleri.....	85
Şekil 4.9 : Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen PSSK hücrelerinde gözlenen 8-OH-dG seviyesi.....	87
Şekil 4.10 : Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen U87MG hücrelerinde gözlenen 8-OH-dG seviyesi.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
g	Gram
X ²	Ki-kare
kg	Kilogram
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
µU	Mikroünite
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
8-OH-dG	8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DA	Diffraktaik asit

Kısaltmalar

Açıklama

DMSO	Dimetil sülfoksit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FBS	Fetal bovine serum
FA	Fisodik asit
PBS	Fosfat tamponlu salin
G1	Gap 1
G2	Gap 2
U87MG	Glioblastoma multiforme hücre hattı
HBSS	Hank dengeli tuz çözeltisi
İTK	İnce tabaka kromatografisi
IUCC	Kansere Karşı Uluslararası Birlik
¹³C-NMR	Karbon-13 nükleer manyetik rezonans
LDH	Laktat dehidrogenaz
LITT	Lazer destekli interstisyel termoterapi
LA	Lobarik asit
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MRS	Manyetik rezonans spektroskopisi
EC₅₀	Medyan etkili konsantrasyon
IC₅₀	Medyan inhibitör konsantrasyonu
MSS	Merkezi sinir sistemi
M	Mitoz
NBM	Nörobazal medyum
OA	Olivetorik asit
PSSK	Primer sıçan serebral korteksi
¹H-NMR	Proton nükleer manyetik rezonans
PA	Psoromik asit
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNA	Ribonükleik asit

Kısaltmalar**Açıklama****RPMI**

Roswell Park Memorial Institute

S

Sentez

CDK

Siklin bağımlı kinaz

SKK

Silika jel kolon kromatografisi

TMS

Tetrametilsilan

TAK

Toplam antioksidan kapasite

TOD

Toplam oksidan durum

UV

Ultraviyole

UA

Usnik asit

VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü

HITT

Yüksek frekanslı termoterapi

1. GİRİŞ

İnsanoğlu eski çağlardan beri, bulunduğu dönemin koşullarını da dikkate alarak tüm imkânları değerlendirmek suretiyle, yaşamını daha sağlıklı bir şekilde sürdürebilme amacını gütmüştür. Edinilen bilginin ve bilimin gelişmesi ile beraber hayatın devam sürecine dair yeni fikirler üreilmeye başlanmış ve zamanı geldiğinde insanoğlunun yaşamına dair sır dolu bilgilerin hücrelerde gizlendiği ortaya çıkmıştır. Zamanın ilerlemesi ve bu süreçte teknolojinin gelişmesi, insan yaşamının devamlılığı açısından hücrelerin sürekli yenilenmesi gerektiği gerçeğini gün yüzüne çıkarmıştır. Yapılan çok yönlü ve ayrıntılı araştırmalar, sürekli faaliyet halinde olan hücrelerin devamlılıkları sona erdiğinde vücuttan atıldıklarını ve yerlerine yeni hücrelerin geldiğini kanıtlamıştır (Berkarda, 1998; Potter ve ark., 2002; Stansfield ve ark., 2003; Bolsover ve ark., 2004; Lodish ve ark., 2008).

İnsan hücrelerinin her birinde 30.000 civarında gen vardır. Genler, canlıların karakteristik özelliklerinin ortaya çıkmasında görevli olan deoksiribonükleik asit (DNA) parçalarıdır. Hücreler arasında meydana gelen yaşam-ölüm döngüsü bu genlerden bazılarının aracılığı ile sağlanmaktadır. Bu genlerden bir kısmı hücrelerin çoğalmasını teşvik ederken, bir kısmı hücrelerin normal şartlardan fazla üremesini engellemektedir. Metabolik faaliyetler sonucu genlerin kontrolü altında mitoz bölünme ile çoğalan hücreler, aktivitelerini kaybettikleri anda homeostasiyi sağlamak amacıyla *apoptoz* adı verilen programlı ölüm sayesinde tasfiye olmaktadır (Kutluk ve Kars, 1994; Berkarda, 1998; Stansfield ve ark., 2003; Lodish ve ark., 2008). Apoptozun haricinde meydana gelen diğer bir ölüm mekanizması ise *nekroz*dur. Bu iki ölüm şekli morfolojik ve biyokimyasal açıdan farklılıklar oluşturmaktadır. Apoptozda genellikle fizyolojik kökenli ölümler gerçekleşirken, nekrozda kaza sonucu hücre hasarına sebep olan ölümler gerçekleşir. Bu özelliğinden dolayı nekroza kontrolsüz hücre ölümü de denmektedir. Apoptoz, sağlıklı bir kişide normal şartlarda bireysel hücreler yerine doku bölgelerinde *düzenleme*, *efektör* ve *yutma* olarak üç aşamada gerçekleşen ve kalıntıların doku sıvısından fagositoz yolu ile kaldırılmasına dayanan bir süreçtir. Nekroz olayında ise hücre parçalandıktan sonra kalıntıları doku sıvısına yayılmakta ve homeostasi bozulmaktadır. Apoptozda ölüm sinyali, efektör aşamasında kaspaz adı verilen sistein-

proteaz grubu enzimler tarafından verilmektedir. Bu enzimler, hücrenin ölümü sırasında morfolojisinde meydana gelen değişimlerin öncüsüdür (Stansfield ve ark., 2003; Bolsover ve ark., 2004; Campbell ve Reece, 2005a; John ve ark., 2008).

Apoptotik veya nekrotik hücre ölümlerinin dışında genellikle çevresel faktörlerin ve beslenme şeklinin etkisi (%85-90) sonucu bir takım genlerin mutasyona uğradığı ve bu olayın sonucunda normal hücrelerin anormal hücrelere dönüştüğü, bu anormal hücrelerin ise alışılmışın dışında kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başladığı görülebilmektedir. Uğradığı mutasyon sonucu özgün halinden farklı bir yapıya dönen ve hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasına sebep olan bu genlere onkogen, onkogenlerin sebep olduğu gerek bölgesel gerekse daha uzak noktalarda hücrelerin çoğalması sonucu meydana gelen habis hastalık grubuna ise *kanser* adı verilmektedir (Kutluk ve Kars, 1994; Berkarda, 1998; Bolsover ve ark., 2004; John ve ark., 2008; Lodish ve ark., 2008; Yokuş ve Çakır, 2012).

Kanser tedavilerinde erken tanı büyük önem arz etmektedir. Özellikle kişinin bilincinin tam olarak oturmadığı çocukluk döneminde ailelere büyük sorumluluk düşmektedir. Çocuklarda bu dönemde tespit edilemeyen bir kanser türü, ilerleyen yaşlarda daha büyük sıkıntıların ortaya çıkmasına sebep olacaktır. Dünya çapında her yıl yaklaşık 160.000 kanser vakasının çocukluk çağına meydana geldiği ve bu vakalardan 90.000'inin ölümlerle sonuçlandığı rapor edilmiştir (John ve ark., 2008). Ülkemizde ise kanserli çocuk sayısının yıllık 3.000 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bu hastalardan %50'si geç teşhis veya tedavi edilememe nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Hatipoğlu, 2007; Anonim, 2014a). Çocukluk dönemi kanser türleri nedeniyle ölüm oranına bakıldığında lösemi, lenfoma, merkezi sinir sistemi (MSS) tümörü ve nöroblastomun üst sıralarda yer aldığı görülmektedir (John ve ark., 2008; Rahman ve Sedky, 2010; Anonim, 2014a).

Çocukluk döneminde en yaygın solid tümör olan ve MSS'de oluşan beyin kanseri, doğum sonrası ilk aylardan başlayarak ilerleyen her yaş döneminde görülebilmektedir. Çocukluk döneminde genellikle beyin dokusu hücrelerinde yer alan tümörler sıklıkla göstermekte, diğer organlara ait tümör metastazlarına çok fazla rastlanmamaktadır. Beyin tümörlerinin her yaş dönemine göre farklı fizyolojik ve morfolojik özellikler

gösterdikleri belirlenmiştir. Erken yaşlarda çoğunlukla arka kafa çukuruna yerleşen tümörler medülloblastomlar, ependimomlar, astrositomlar ve beyin sapı gliomlarıdır. İlerleyen yaşlarda görülen tümör tipi ise genelde beyin dokusundan türevlenmektedir. Erişkinlerde karşılaşılan beyin kanseri türleri içerisinde en sık görüleni ve en tehlikeli malign seyir göstereni kısaca glioblastoma olarak da bilinen glioblastoma multiformedir (Algier, 1998; Bruce ve Kennedy, 2009; Anonim, 2014b).

Glioblastoma, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün belirlediği kanser sınıflandırmasında en tehlikeli ve agresif olan dördüncü derece tümörler içerisinde yer almaktadır. Tüm beyin tümörlerinin %15'ini oluşturan glioblastomada, hastaların çoğunun ilk bir buçuk yıl içerisinde yaşamlarını kaybettikleri belirlenmiştir (Bruce ve Kennedy, 2009; Anonim, 2014b).

Yıllardır kanser hastalığına kesin bir çözüm bulunamamış, geliştirilen tedavi yöntemleri yetersiz kalmıştır. En sık tercih edilen tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi aracılığı ile anormal bir şekilde çoğalma gösteren kanserli hücrelerin yanı sıra sağlıklı hücrelerin de öldüğü ve bu durumdan dolayı uzun savunma sisteminin hasar gördüğü belirlenmiştir (Burstein, 2000; Partridge ve ark., 2001; Kawai, 2002; Kayl ve Meyers, 2006; Stoehlmacher, 2007; Polikandrioti ve ark., 2010; Mavrogenis ve ark., 2010; McKeon, 2012; Chan ve Ismail, 2014; Clavagnier, 2014; Cohen, 2014; Perrino ve ark., 2014). Diğer bir tedavi yöntemi olan radyoterapinin (ışın tedavisi) de yan etkileri ihmal edilemeyecek düzeydedir (Alberti, 1997; Postelmans ve ark., 1999; Dieckmann ve ark., 2002; Mendes ve ark., 2002; Naka ve Kawahara, 2002; Popanda ve ark., 2006; Tan ve ark., 2006; Verrone ve ark., 2013; Pettersson ve ark., 2014; Shandiz ve ark., 2014).

Kanser hastalıklarının çok çeşitli olması, tedavide farklı yöntemlere başvurulmasına yol açmaktadır. Beyin tümörlerinin çok zor prognoz göstermesi, beyin kanserini kanser hastalıkları içerisinde tedavisi en güç hastalık gruplarından biri haline getirmektedir. Yüzden fazla çeşidi olan birincil beyin tümörlerinin bir dizi biyolojik ve klinik tezahürü mevcuttur. Bu yüzden birçok onkolog ve patolog, beyin tümörlerinin tanı ve tedavisinde büyük zorluk yaşamaktadır (Palmieri ve ark., 2009; Fronza ve ark., 2012; Nakata ve ark., 2013; Hatzoglou ve ark., 2014; Wikman ve ark., 2014). Benign veya malign beyin tümörlerinin her ikisinin de tedavisi için cerrahi yöntemle başvurulmasına rağmen,

tümörün beyinde bulunan çok hassas bölgelere yerleşmesi durumunda hayati tehlike ortaya çıkmaktadır. Bu durumda cerrahi yöntemden vazgeçilerek, genetik uygunluğun olması şartıyla, kemoterapi yöntemiyle kabul edilebilir bir ömür uzatması gerçekleştirilebilir. Fakat genetik uygunluğun olmadığı durumlarda kemoterapi tedavisinin sonuç vermediği gözlenmiştir (Little ve ark., 1998; Li ve ark., 2005; Blakeley ve Grossman, 2012; Boogerd ve ark., 2012; Arslan ve ark., 2014; Peng ve ark., 2014). Bu süreçte alternatif tedavi başlığı altında yer alan, bitkisel kökenli ürünlerin kombine edilmesi ile gerçekleştirilen tedavi yöntemleri ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Son yıllarda bazı bitki ekstraktları aracılığı ile gerçekleştirilen tedavi süreçlerinde kolon kanseri (Ranneh ve Ali, 2012; Wesołowska ve ark., 2012; Ryu ve ark., 2013), lösemi (Inagaki ve ark., 2013; Muirhead, 2013; Dhillon ve ark., 2014; Janiak, 2014; Solmaz ve ark., 2014), mide kanseri (Kim ve ark., 2005; Ghazanfari ve ark., 2012; Stewart ve ark., 2013; Overby ve ark., 2014), karaciğer kanseri (Loa ve ark., 2009; Singh ve ark., 2011; Stagos ve ark., 2012; Waiyaput ve ark., 2012) ve yumurtalık kanseri (Yu ve ark., 2013; Ahmad ve ark., 2014; Yu ve Chen, 2014; Johnson-Ajinwo ve ark., 2015) gibi birçok hastalıkta yüksek oranda olumlu sonuçlara ulaşılmıştır. Kullanılan bitki ekstraktları, yapılarında barındırdıkları metabolitler sayesinde pek çok hastalıkta tedavi edici bir rol üstlenmektedir. Bitkiler için en çok arzu edilen, bu metabolitlerin miktar olarak fazla olması ve amaca uygun özellikleri taşımalarıdır.

Mikobiyont kısmını mantarların, fotobiyont kısmını ise alglerin meydana getirdiği simbiyotik organizmalardan likenler, yeryüzünde başka hiçbir canlıda bulunmayan yalnızca kendilerine has metabolitleri üretebilen ilginç canlılardır (Nash, 2008). Likenlerin ürettikleri metabolitler sekonder metabolit olarak adlandırılmakta ve bu canlılar ekstraktlarında %25 oranında sekonder metabolit içerebilmektedir (Brodo ve ark., 2001). Likenlerde bu kadar yüksek oranda sekonder metabolit bulunması ve bu metabolitlerin kendilerinden başka hiçbir canlıda olmaması (Öztürk ve Aslan, 1991) likenlerin birçok biyolojik aktivitesinin incelenmesine yol açmıştır. Antimikrobiyal (Aslan ve ark., 2006; Cansaran ve ark., 2006; Gulluce ve ark., 2006; Yücel ve ark., 2007; Ranković ve ark., 2011, 2012; Kosanić ve ark., 2013, 2014; Grujić ve ark., 2014) antiviral (Karagöz ve Aslan, 2005), antiinflamatuvar (Süleyman ve ark., 2002, 2003; Halici ve ark., 2005; Odabasoglu ve ark., 2006), antioksidan (Gülçin ve ark., 2002; Halici ve ark., 2005; Aslan ve ark., 2006; Cansaran ve ark., 2006; Odabasoglu ve

ark., 2006; Gulluce ve ark., 2006; Yücel ve ark., 2007; Ranković ve ark., 2011, 2012; Paudel ve ark., 2012; Ghate ve ark., 2013; Kosanić ve ark., 2013, 2014; Colak ve ark., 2014; Grujić ve ark., 2014), antialerjen (Huneck, 1999; Kirmizigul ve ark., 2007), immünolojik (Ögmundsdóttir ve ark., 1998; Kirmizigul ve ark., 2007), antigenotoksik ve antimutajenik (Russo ve ark., 2006; Geyikoglu ve ark., 2007; Zeytinoglu ve ark., 2008; Agar ve ark., 2010; Turkez ve ark., 2010; Alpsoy ve ark., 2011; Kotan ve ark., 2011; Aslan ve ark., 2012) gibi birçok alanda likenlerden yararlanılmıştır. Daha spesifik bakıldığında, likenlerin tüberküloz (Vartia, 1973), hemoroit ve dizanteri (Dülger ve ark., 1998) hastalıklarında tedavi amaçlı, prostat (Russo ve ark., 2008) ve bağırsak (Bézivin ve ark., 2003) gibi organlarda ise apoptozu indükleyici olarak kullanıldıkları rapor edilmiştir. Aynı şekilde birçok liken türünün farklı organlar üzerindeki antikanser aktiviteleri de çalışmalara yansımıştır (Lin ve ark., 2003; Russo ve ark., 2008; Zeytinoglu ve ark., 2008; O'Neill ve ark., 2010; Ranković ve ark., 2011, 2012; Melo ve ark., 2011; Manojlović ve ark., 2012a; Cheng ve ark., 2013; Özenoğlu ve ark., 2013; Pejin ve ark., 2013; Singh ve ark., 2013; Ghate ve ark., 2013; Kosanić ve ark., 2013, 2014; Ari ve ark., 2014b; Çelikler Kasımoğulları ve ark., 2014; Grujić ve ark., 2014).

Daha önce yapılan araştırmalarda, liken sekonder metabolitlerinin bir insan beyin tümörü olan glioblastoma multiforme hücre hattı (U87MG) üzerindeki sitotoksik etkilerinin henüz tespit edilmediği anlaşılmıştır. Bu nedenle; mevcut çalışmada, diffraktaik asit (DA), fisodik asit (FA), lobarik asit (LA), olivetorik asit (OA), psoromik asit (PA) ve usnik asit (UA) liken sekonder metabolitlerinin U87MG hücreleri üzerindeki antitümorejenik aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında, primer sıçan serebral korteks (PSSK) hücreleri üzerinde de araştırmalar gerçekleştirilmek suretiyle, liken sekonder metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak sağlıklı ve kanserli beyin hücreleri üzerindeki etkileri ortaya çıkarılmıştır.

Bu araştırma sonucunda elde edilen bulgular sayesinde, çağımızın ölümcül hastalıklarından olan beyin kanserini tedavi amacıyla uygulanan kimyasal ve ışımsal yöntemlerin, beyin kanseri hastaları üzerindeki olumsuz etkileri göz önüne alındığında, yan etkileri minimum düzeye indirecek alternatif tedavi yöntemlerini geliştirmek suretiyle modern tıbbı katkı sağlanacağı ümit edilmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kuramsal Temeller

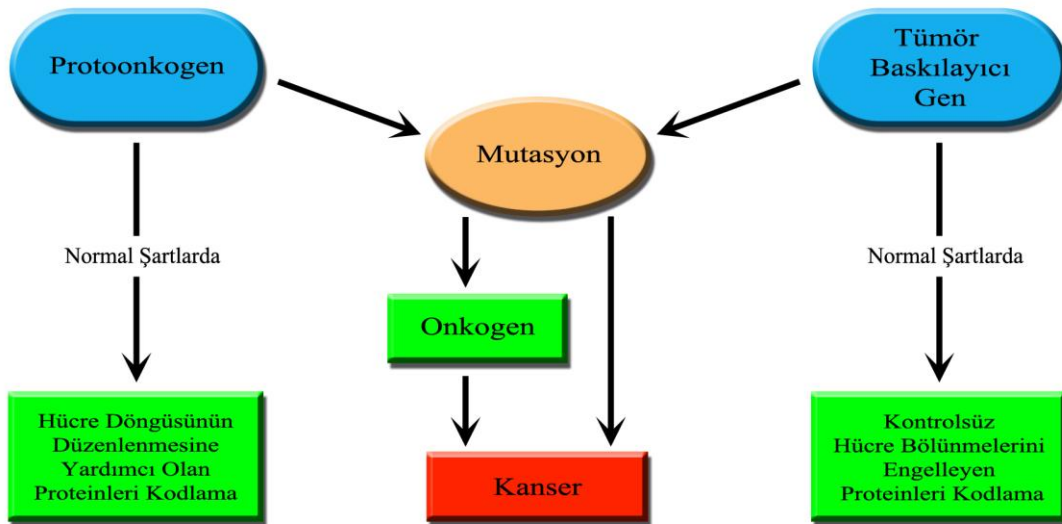
2.1.1. Kanserin Genetik Yolakları

Kanser genleri; onkogenler, tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler) ve protoonkogenler olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır (John ve ark., 2008). Bu genler içerisinde onkogenler 1970'li yılların sonlarına doğru keşfedilmeye başlanmış ve ilk olarak hayvanlarda tümör oluşturan akut transforne edici retrovirüslerin genomunda bulunmuştur. O tarihlerden günümüze kadar sürekli araştırma konuları içerisinde yer alan onkogenler, kanser hastalığının içeriğinin daha iyi anlaşılabilmesi, teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi açısından önemli ipuçları vermiştir (Berkarda, 1998).

Onkogenler, karsinojen ajanların DNA molekülündeki şeker molekülleri, pürin ve pirimidin bazıları ile reaksiyona girerek veya kromozomların yapısında bulunan proteinlere bağlanarak DNA molekülünde delesyonlara, inversiyonlara veya zincir kırıklarına sebep olan genlerdir. Bu genler, DNA üzerinde oluşturduğu yapısal değişiklikten dolayı replikasyon, transkripsiyon veya translokasyon faaliyetlerinde kusurlara sebebiyet vermektedir (John ve ark., 2008; Yokuş ve Çakır, 2012).

Onkogen olarak aktifleşmiş bir gen sürekli hücre bölünme sinyali vermektedir. Bu özelliğinden dolayı onkogenler tümör başlangıcına, yayılmasına ve ilerlemesine sebep olmaktadır. Onkogenlerin insan hayatını en fazla riske sokan özelliği, kanserin en kritik aşaması olan *metastaz* olayını meydana getirmesidir. Genellikle kanser hastalarının kaybedildiği metastaz olayı, hücrelerin aşırı çoğalmasıyla dokularda oluşan tümörün uzak doku ve organlara yayılması olarak tanımlanmaktadır. “Metastaz” kelimesi, Yunanca “bir sonraki” veya “öte” anlamına gelen “meta” ile “yer” veya “konum” anlamına gelen “stasis” kelimelerinin bir araya gelmesi sonucu oluşmuştur. Dolayısıyla metastazı konum değiştirmiş lezyon olarak da tanımlayabiliriz (Derman, 1998; John ve ark., 2008).

Tümör baskılayıcı genler, onkogenlerin faaliyetine kıyasla zıtlık göstermektedir. Bu genler normal şartlarda tümör oluşumunu inhibe etmektedir. Başka bir deyişle kanseri önleyen genler olarak tanımlanabilirler (Şekil 2.1). Hücre döngüsünü kontrol lokalitelerinde görevli olan tümör baskılayıcı genler, döngü esnasında meydana gelebilecek genetik hasarları yok ederek veya hasara uğrayan hücrelerde apoptoza neden olarak kanserli hücrelerin ortaya çıkmasını engellemeye çalışırlar. Rb geni, P53 geni, siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri, kadherinler ve BRCA-1/2 tümör baskılayıcı genlere örnek verilebilir. Normalde hücre bölünmesini sınırlandıran tümör baskılayıcı genlerin birkaçında ortaya çıkan mutasyonlar, hücre döngüsünün inhibisyonunu engellemek suretiyle anormal hücre büyümesine neden olmakta ve tümör oluşturmaktadır (Derman, 1998; John ve ark., 2008).



Şekil 2.1 Kanser genleri ve fonksiyonları

Protoonkogenler, hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için aldıkları sinyalleri ileti mekanizmasında ve protein sentezinde görevli olan genlerdir. Hücrelerin düzenli bir şekilde çoğalmasından sorumlu olan genler protoonkogenlerdir. Doğal koşullarda insan sağlığı açısından sıkıntılı bir gen olmayan protoonkogenler hücrelerde inaktif durumda duyarlı noktalar olarak bilinmektedir. Fakat protoonkogenler mutasyonlar veya gen ekspresyonundan dolayı aktif hale geçerek onkogenlere dönüşebilmektedir. Mutasyona uğramış protoonkogenler esas görevleri olan büyümeyi

düzenleyici protein kodlama işlevlerini kaybederek, büyüme faktörlerinin çok fazla üretimine, hücre membranı ve çekirdek arasındaki ara yolların kontrolsüz bir şekilde uyarılmasına ve transkripsiyon faktörlerinin sentezinin artmasına neden olmak suretiyle kanser hücrelerinin kontrol dışı üremelerine ve büyümelerine yol açmaktadır. Protoonkogenler proteinlerinin önüne c [cellular (c-Fos, c-Myc)], onkogenlerin önüne ise v [viral (v-Fos, v-Myc)] ekleri getirilerek isimlendirilmektedir (Kutluk ve Kars, 1994; Derman, 1998; Yokuş ve Çakır, 2012; Anonim, 2014c).

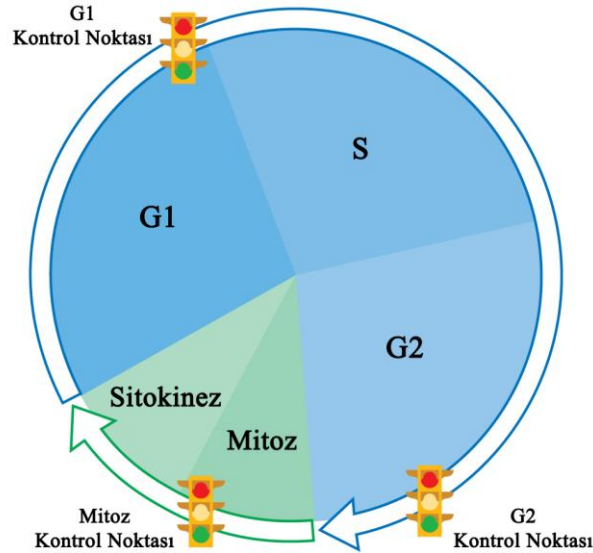
2.1.2. Hücre Döngüsü ve Kanserle İlişkisi

Proliferasyon (çoğalma), diferansiyon (farklılaşma) ve apoptoz mekanizmaları hücre içerisinde yer alan önemli basamaklardır. Bu basamaklarda gerçekleşecek her faaliyet organizmanın devamlılığı açısından son derece önemlidir. Basamaklardan ilkinin oluşturduğu proliferasyon fonksiyonunun gerçekleşmesi amacıyla hücreye uyarı sinyali gönderilmekte ve bu sayede indüklenen hücrede bir takım geçici biyokimyasal aktiviteler ve morfolojik değişimler meydana gelmektedir. Bu sürecin tamamı *hücre döngüsü* adını almaktadır. Hücre döngüsünün bu mekanizmaların düzenlenmesinden sorumlu olması, bu döngünün fizyolojik ve patolojik olayların birçoğunda ne kadar önemli olduğu gerçeğini ortaya çıkarmaktadır (Bolsover ve ark., 2004; Postlethwait ve Hopson, 2006a; Lodish ve ark., 2008).

Son zamanlarda yapılan birçok araştırma hücre döngüsünde görevli olan proteinler ile onkogenler arasında önemli bağlantıların olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında meydana gelen değişimler kanser gelişimine sebep olabilmektedir. (Pucci ve Giordano, 1999; Li ve ark., 2013; Arsov ve ark., 2014; Fan ve ark., 2014; Gong ve ark., 2014; Lee ve ark., 2014; Niu ve ark., 2014; Okuno ve ark., 2014; Liu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015).

Sağlıklı bir kişide mitoz bölünme sayesinde sürekli çoğalan hücrelerde mitozdan sonraki döngü gap 1 (G1), sentez (S), gap 2 (G2) ve mitoz (M) olarak devam etmektedir (Şekil 2.2). G1, S ve G2 aşamalarının tümü interfaz olarak isimlendirilmektedir. Bu döngü içerisinde hücre, uyarı sinyalleri almakta ve ardından hücrenin büyüme işlemi

gerçekleşmekte veya hücre, bölünme sinyali almadığı durumda ise dinlenme fazı olarak da tanımlanan G2'de durmaktadır. İnterfaz evresi hücre döngüsünde %90'lık kısmını kapsayıp 16-24 saat devam ederken, mitoz bölünme evresi 1-2 saatlik bir süreci içermektedir. G1 evresinde hücreler çevrelerindeki uyarıları dikkate alarak büyümelerini teşvik etmektedir. Bu uyarılar sonucunda DNA replikasyonu için ön hazırlık yapılmakta ve ardından ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezi meydana gelmektedir. G1 evresindeki hazırlıkların ardından DNA sentezi S evresinde gerçekleşmektedir. İnterfaz evresinin sona basmağı olan G2, hücrenin büyümeye devam ettiği, RNA ve protein sentezinin tekrardan meydana geldiği kısımdır. İnterfaz evresinin devamında hücre profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşan mitoz bölünme aşamasına geçecektir. Hücre döngüsü içerisinde herhangi bir evrenin sonlanmadan diğerine geçilmesi durumunda, genetik materyal sorunsuz bir şekilde kopyalanamadığından hücrede hasarlar oluşabilmektedir. Hücre döngüsünde, döngünün devam edip etmeyeceğine karar verilen bazı kontrol noktaları mevcuttur. Bu noktalar, G1-S, G2-M ve metafaz-anafaz geçişlerinde yer almaktadır (Stansfield ve ark., 2003; Bolsover ve ark., 2004; Johnson ve Raven, 2004a; Campbell ve Reece, 2005a; Lodish ve ark., 2008).



Şekil 2.2 Hücre döngüsü basamakları

Siklinler, hücre döngüsü basamaklarını kontrol eden protein grubudur. Herhangi bir siklin grubunun işlevini sonlandırmasının ardından diğer siklin grubu devreye

girmektedir (Schwaller ve ark., 1997; Ho, 2002; Foster ve ark., 2010). DNA replikasyonu yani hücre kopyalanma mekanizması, CDK'lerden meydana gelmektedir. Başta inaktif olan CDK molekülleri, hücre döngüsünün bazı evrelerinde sentezlenen siklinler aracılığı ile aktif hale gelmektedir (S. Liu ve ark., 2013; Van ve ark., 2014; Xu ve ark., 2014).

Siklin A, Siklin B, Siklin C ve Siklin D proteinleri ile CDK 1, CDK 2, CDK 3, CDK 4, CDK 5 ve CDK 6 proteinleri hücre döngüsü sürecinde birbirleri ile devamlı ilişki halindedir. Çoğunlukla hazırlık aşaması olarak tanımlanan G1 evresinin orta ve son dönemlerinde siklin proteinleri ile CDK proteinlerinin bağlantılı oldukları tespit edilmiştir. Hücrede mevcut olan Siklin D grubunun sayısı, büyümeyi indükleyen sinyal ile beraber artmakta ve hücre içerisinde Siklin D ile uyumlu CDK'ler aktif hale geçmektedir. Bu durumun sonucunda Siklin D sentezi kontrol dışı bir hal almakta ve oluşan bu mutasyon hücrenin S fazına geçmesini mecbur bırakmaktadır. Tüm bu süreç ise neoplastik transformasyon denilen kontrolsüz çoğalmayı meydana getirmektedir (Ohtsubo ve ark., 1995; Weinberg, 1995).

Hücre döngüsü içerisinde, siklin proteinlerinin CDK proteinleri oluşturduğu yapılar, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin etkilerine maruz kalmaktadır. Birçok onkogen ve tümör baskılayıcı gen, G1 evresinin ilk aşamalarının gerçekleşmesini sağlayan ve DNA replikasyon basamağının G1 evresinden S evresine geçişinden sorumlu olan CDK'lerin aktivitelerini yükseltmektedir. Bazı protoonkogen ve tümör baskılayıcı genler ise DNA sentezinden sorumlu olan Siklin A-CDK 2 kompleksinin aktivitesini yükseltmektedir (Adams, 2001; Bremner ve Zacksenhaus, 2010; Harrison ve ark., 2011).

Hücre döngüsünde CDK'lerin durdurulmasını sağlayan INK4 olarak adlandırılan p16, p15, p18, p19 isminde dört adet inhibitör grubu ve ayrıca p21, p27, p57 olarak bilinen yine üç adet inhibitör mevcuttur (Haddad ve ark., 1999; Pavletich, 1999). Oluşabilecek muhtemel DNA hasarında tümör baskılayıcı genler devreye girmekte ve döngüyü durdurmaktadır. Hücrede hasarlı veya replike edilmemiş DNA meydana geldiğinde M evresine geçiş olmamakta, G2 evresinde döngü sonlanmaktadır. Eğer orta dereceli bir DNA hasarı G1 evresinde tespit edilmişse, p53 olarak adlandırılan tümör baskılayıcı

gen tarafından p21 proteini üretilmekte ve bu protein CDK'leri inhibe ederek döngüyü G1 veya G2 evresinde sonlandırmaktadır. Tüm bu durumların dışında DNA'da oluşan hasar onarılamayacak kadar büyükse p53 geni hücrenin apoptoza uğramasını sağlayacaktır (Pediconi ve ark., 2003). Bahsedilen bu süreç sağlıklı bir insanda olması gerekenleri içermektedir. Fakat kanserli bir kişide bulunan onkogenler hücre döngüsünün normal işleyiş sürecini olumsuz yönde etkilemektedir. Bazı onkogenler organ veya dokular içerisinde yeterli düzeyde proliferasyona uğramayan hücreleri ortadan kaldırarak apoptoz olayını indüklemektedir (Smith ve ark., 1993; Fearnhead, 2004).

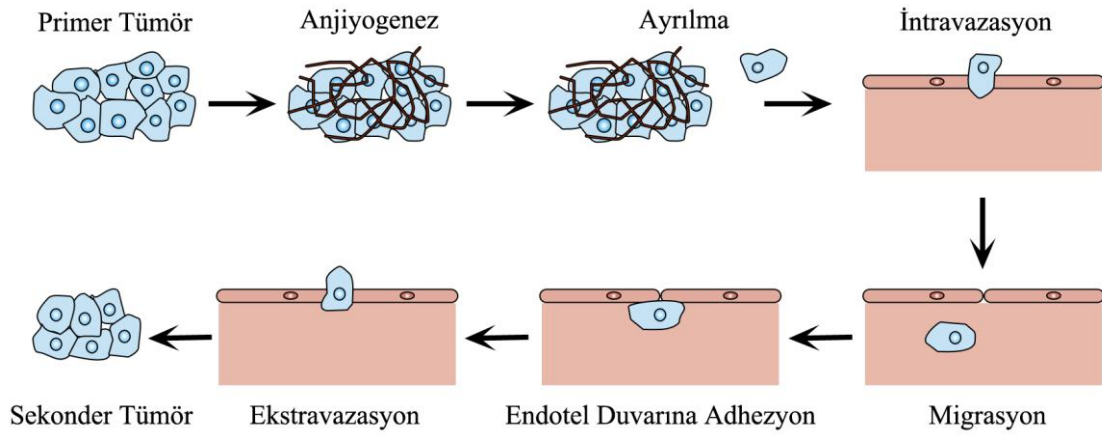
2.1.3. Metastaz Süreci

Sağlıklı bir kişinin herhangi bir organ veya dokusundaki hücre büyümesi kanserli bir kişiye oranla daha hızlıdır. Fakat kanser hastalarının ilgili organ veya dokularındaki hücrelerin yaşam süresi ve bölünme hızı daha yüksektir. Bu nedenle hücrelerin büyüme aşamasında kanserli bölgelerde hacim olarak daha büyük kanser hücreleri meydana gelmektedir (Derman, 1998).

Kanserli dokuların hacim olarak fazla alan kaplaması için kan desteğine ihtiyacı vardır. Kanser sürecinin başlangıç aşamasında, meydana geldikleri dokuda bulunan kılcal damarlar aracılığı ile difüzyon sayesinde beslenen tümör hücreleri, başka bir damar oluşumuna ihtiyaç duymadan 2-3 mm boyuta ulaşabilir. Bu koşullarda kanserli hücreler daha hızlı çoğalabilir. Fakat çoğalma hızları ile orantılı olarak apoptoz olayı da artmaktadır. Tümör dokusunun hacmini artması için beslendiği kan damarlarının da artması gerekmektedir. Bu durumda dokularda bulunan mevcut kan damarları filizlenme yolu ile yeni damarlar meydana getirmektedir ki bu olay *anjyogenez* adını almaktadır. Kan akımının sürekli devam etmesi sayesinde apoptoz oranı düşmekte ve tümörün hızlı bir şekilde büyüyerek metastaz olayını gerçekleştirme oranı artmaktadır (Derman, 1998; Postlethwait ve Hopson, 2006a; Kerbel ve Ellis, 2008; Song ve ark., 2008). Primer kanser adı verilen, kanserli dokunun vücutta ortaya çıktığı kısımdan başka bir bölgeye dağılamayan kanser tiplerinde, kanserin toplardamar ve lenfatik drenajı, endotel hücrelerinin aktivasyonu, endotel hücrelerindeki glikozaminoglikanlara bağlanmayı

sağlayan aktivitelerin mevcudiyeti metastaz olayını etkileyen faktörlerin bir kısmını oluşturmaktadır (Derman, 1998). Endotel hücrelerinin aktivitesi haricinde anjiyogenez olayında rol oynayan diğer bir etken vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)'dür. Tümörlü dokuda VEGF, yeni kan damarlarının oluşması amacıyla bölgedeki büyüme faktör üretimini artırmakta ve apoptoz olayını inhibe etmektedir (Smith ve ark., 1993; Song ve ark., 2008).

Metastaz olayının ilk basamağı olan anjiyogenezden sonra *invazyon* denen ve üç aşamadan oluşan aktivite meydana gelir. İnvazyonun basamakları sırasıyla; *ayrılma (detachment)*, *tutunma (attachment)*, *proteoliz ve hücre migrasyonu*dur (Şekil 2.3). İnvazyon olayında kanserli hücre, dokusudan ayrılarak damar içerisinde ilerlemeye başlar. Hedef organın bölgesine geldiğinde endotel duvarına tutunur ve duvarı eritmek amacıyla lizozomal enzimler salgılar. Artık hedef organın damarlarında dolaşmaya başlayan kanser hücresi vücudun bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmeye çalışılmaktadır. Konakçının savunma mekanizmasına yardım eden en etkili gen tümör baskılayıcı genidir. Bağışıklık sisteminin kanserli hücelere karşı gösterdiği bu tepki *immün denetimi*, bu aşama ise *intravasküler faz* olarak bilinmektedir. Bir kanser hücresi oluştuğunda, bu hücrenin vücudun bağışıklık sistemi tarafından tanınıp parçalanması yüksek olasılıktır. Böyle bir durumda vücutta oluşan binlerce kanser hücresi bağışıklık sistemi tarafından yok edilebilmektedir. Fakat bazı olumsuz koşullar nedeniyle hücrel immün cevabının baskılandığı durumlar söz konusu olabilmektedir. Bu durumda hayatta kalan kanser hücresi damar içerisine sızmak suretiyle kanla beraber vücudun diğer bölgelerinde dolaşmaya başlar. Bu dolaşma faaliyeti *migrasyon* olarak tanımlanmaktadır. Son olarak damar içerisinde hareket halinde olan tümör hücreleri istedikleri organların damar yüzeyine tutunarak *ekstravazasyon* olayını gerçekleştirmek suretiyle damarı terketmekte ve ilgili organın parankimasında sekonder tümörü meydana getirerek metastaz olayını tamamlamaktadır (Mandel, 1998; Campbell ve Reece, 2005a; Cantley ve Carpenter, 2008; John ve ark., 2008).



Şekil 2.3 Metastaz basamakları

Damar içerisine giren binlerce tümör hücresinden yalnızca birinin metastaz yapabildiği belirlenmiştir (Mandel, 1998). Lokal olarak büyüyen tümörlerin yanı sıra sekonder tümör olarak adlandırılan metastatik tümörlerden bazıları kan ve lenf yollarıyla organ seçimi yaparak istedikleri organı sarmaktadır. Bu süreç ayları hatta yılları kapsayabilir. Mide tümörünün genellikle karaciğere, meme tümörünün kemiğe ve akciğere, kemik tümörünün ise akciğere metastaz yaptığı bilinmektedir. Bu spesifik metastaz olaylarını, organın damar yapısının, kanser hücrelerinin yüzey özelliklerinin ve organların damar duvarındaki hücrelerin yüzey özelliklerinin etkilediği tespit edilmiştir (Moshtaghi ve ark., 1995; Cantley ve Carpenter, 2008; Mitacek ve ark., 2008; Sánchez ve ark., 2009; Habermehl ve ark., 2011; Kim ve ark., 2014).

2.1.4. Tümör Çeşitleri

Bir doku veya organdaki neoplazmaların genellikle ayırt edilebilecek şekilde büyüyerek meydana getirdikleri kitle olarak tanımlanan tümörler farklı şekillerde (Çizelge 2.1) sınıflandırılabilir (John ve ark., 2008). Temel olarak benign (iyi huylu veya selim) ve malign (kötü huylu veya habis) olarak ikiye ayrılan tümör grubundan malign tümörler metastaza sebep olduklarından riskli grubu teşkil etmektedir. Benign tümörlerin büyüme kapasiteleri sınırlıdır ve metastaz oluşturmazlar. Aşırı olarak çoğaldıkları bölgede basınç meydana getirdiğinden dolayı o bölgede şişliğe sebep olmaktadır. Benign tümörler belirli bir yerle sınırlı kaldıklarından dolayı cerrahi yollarla uzaklaştırılabilir. Fakat mevcut benign tümörün yayıldığı organın işlevini

bozmayacak derecede çoğalmamış olması gerekmektedir. Bu koşullarda hastanın sağlığına kavuşması mümkündür. Primer tümör hücrelerinin dolaşım sistemi yolu ile uzak bölgelerdeki organlara dağılarak o bölgede oluşturdukları sekonder tümörler ise kanserden yaşam kaybının temel sebebidir. Bu olaya sebep olan tümör çeşidi malign tümördür (Campbell ve Reece, 2005a; John ve ark., 2008). Çoğu metastatik vakada malign hücre büyümesine sebep olarak genomik kararsızlık gösterilmektedir (John ve ark., 2008).

Tümörler iyi veya kötü huylu olarak sınıflandırılmasının yanı sıra kökenine göre yani başlangıçtaki hücrenin geldiği doku çeşidine göre karsinom (epitelyom) ve sarkom olarak da gruplandırılmaktadır. Karsinom tümör epitel dokusundan, sarkom tümör ise mezankimden türevlenen malign tümör olarak bilinmektedir (Derman, 1998).

Kanser hastalıklarında hastalığın derecesi tümörün bir takım özellikleri göz önünde bulundurularak tespit edilir. TNM olarak kısaltılan, primer tümör büyüklüğünün “T” ile, kanserli hücrelerin lenf düğümlerine dağılıp dağılmama durumunun “N” ile, kanserli hücrelerin uzak bölgelere dağılıp dağılmama durumunun (metastaz) ise “M” ile simgelandiği bu sınıflandırma sistemi “Kansere Karşı Uluslararası Birlik (IUCC)” tarafından hazırlanmış ve günümüzde halen yararlanılan araç özelliğindedir. Her solid tümörün kendine has özellikleri olmakla beraber TNM sistemi hastalığın dönemi ve derecesi hakkında önemli bilgiler verebilmektedir (Sobin ve Fleming, 1997; Palleri ve ark., 2010). Hastalığın derecelendirilmesinde bir diğer yöntem ise *linik evreleme* sistemidir. Bu sistemde, TNM sınıflandırmasında yer alan anatomik özelliklerin haricinde laboratuvar ve klinik açıdan ölçütler dikkate alınmakta ve bu özelliklere göre sınıflandırma yapılmaktadır. Bazı araştırmacılar ise hastanın yaşam kalitesini veya tedavi sürecinde meydana gelen yan etkileri göz önünde bulundurarak bir derecelendirme sistemi geliştirmekte ve bu sistemi klinik araştırmaların karşılaştırmalı değerlendirmelerinde kullanmaktadırlar. Bu sınıflandırma sistemleri farklı özellikleri barındırıyor gibi gözükse de temelde birbirlerine paralellik göstermektedir (Derman, 1998).

Çizelge 2.1 Tümör çeşitleri

Kaynak Doku	Benign Tümör	Malign Tümör
1. Yüzey epitel	Papillom	Karsinom skuamöz veya epidermoid hücre, transisyonel hücre
2. Bez epitel	Adenom	Adenokarsinom
3. Bağdokusu		
Fibröz doku	Fibrom	Fibrosarkom
Kıkırdak	Kondrom	Kondrosarkom
Kemik	Osteom	Osteosarkom
Yağ	Lipom	Liposarkom
Kan damarı	Hemangiom	Hemangiosarkom
Lenf damarı	Lenfangiom	Lenfangiosarkom
Düz kas	Leyamiyom	Leyomiyosarkom
Çizgili kas	Rabdomiyom	Rabdomiyosarkom
4. Lenfoid doku		Hodgkin lenfoması Hodgkin dışı lenfomalar
5. Eritrositler		Eritrolösemi
6. Miyelositler		Miyelositer lösemiler
7. Plazmositler		Multipl myeloma
8. Sinirsel tümörler		
Glia hücresi		Glioma (Astrositom)
Retina		Retinoblastom
Meninksler	Meningiom	Meningosarkom
Nöroektoderm	Nevus	Nöroblastom
9. Diğer dokular		
Böbrek		Nefroblastom (Wilms)
Meme	Fibroadenom	Meme kanseri
Melanoblast	Nevus pigmentosus	Melanom
Multipotent	Teratom	Teratokarsinom
Over	Granülosa hücreli	Koryokarsinom (seröz, müköz veya anaplastik)
	Arenoblastom vs.	
Plasenta	Mol hidotiform	Koryokarsinom
Testis	İnterstisyel hücreli tümör	Seminom Cabriyonal karsinom

2.1.5. Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma multiforme, WHO'nun belirlediği kısa tanıma göre glioblastoma, astrositomların en tehlikeli formu olan en yüksek dereceli (dördüncü derece) glioma tümörüdür (Zhang ve ark., 2012; Anonim, 2014b). Beyinde oluşan bir tümör çeşidi olan glioma, astrosit (yıldızlı hücre, astroglia) denilen glia hücrelerinden türevlenmektedir. Glia hücreleri, beyin ve sinir sisteminde nöronları koruyucu ve destekleyici göreve sahiptir. Ayrıca glia hücrelerinin, nöronların madde alış-verişi yaptıkları çevre üzerinde etkili değişiklikler gerçekleştirdiği de bilinmektedir (Campbell ve Reece, 2005b; Postlethwait ve Hopson, 2006b).

Glioblastomanın her zaman hızla büyümesi ve yüksek malign karakter göstermesi, tümör sınıflandırılmasında glioblastomayı en tehlikeli olan dördüncü sınıfa iten özelliklerin başında yer almaktadır. Ayrıca, nekrozun gerçekleşmesi ve tümör etrafındaki kan damarlarının fazlalığı da glioblastomayı diğer tümör sınıflarından ayıran histolojik özelliklerdir (Anonim, 2014b). Glioblastomanın MSS'de meydana gelmesi bu hastalığın tedavisini zorlaştırmaktadır. Çünkü MSS, diğer organ sistemlerinin aksine rejeneratif kapasiteye sahip değildir ve hasar görmesi durumunda yıkıcı sonuçlar doğurabilmektedir. Ayrıca kan-beyin bariyerinden dolayı birçok kemoterapötik ilaç etkisiz kalmaktadır (Goldlust ve ark., 2008).

Her yıl yaklaşık 20.500 primer beyin tümörü vakası meydana gelmekte ve yaklaşık 13.000 kişi bu sebepten dolayı hayatını kaybetmektedir (Goldlust ve ark., 2008). Primer beyin tümörlerinin yaklaşık %50'si glioma, gliomaların ise %50'si glioblastomadır. Erkeklerde bayanlara oranla daha sık rastlanan glioblastoma genellikle 45-65 yaş aralığında görülmektedir (Bruce ve Kennedy, 2009; Anonim, 2014b).

Glioblastoma nadiren beyin dışında bir bölgeye yayılmaktadır. Yalnızca beyin içerisinde, ana tümör bölgesinden farklı bölgelere hareket etmektedir. Glioblastomada halkasal bir yayılım görülmektedir. Tümör merkezinden uzaklaştıkça tümörün çok uzak noktalarında oran düşük olsa bile tümör hücresine rastlamak mümkündür. Bu durum glioblastoma hastalığında beynin bir kısmının değil tamamının tümör hücreleri ile istila edildiğini göstermektedir. Glioblastomaya yakalanan kişilerin %1-7 oranının hastalığın

teşhisi anında birden çok tümöre sahip oldukları tespit edilmiştir (Bruce ve Kennedy, 2009; Zhang ve ark., 2012; Anonim, 2014b).

Glioblastoma kendi içerisinde primer ve sekonder glioblastoma olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Primer glioblastoma, glioblastomanın en yaygın ve agresif olanıdır. Ani bir şekilde meydana gelen primer glioblastomaya yakalanan kişilerin yaşam süresi ortalama 3 ayla kısıtlıdır. Glioblastomanın %60'ını oluşturan primer glioblastomanın görüldüğü yaş aralığı genellikle 55 yaş ve üstüdür. Sekonder glioblastoma, tüm glioblastomalar içerisinde %40'luk bir oranı oluşturmaktadır. Genellikle 45 yaş ve altı kişilerde görülebilen sekonder glioblastoma düşük derecede bir agresifliğe sahiptir. Bu hastalığa yakalanan kişilerin 10 yıla kadar yaşayabildikleri tespit edilmiştir. (J. M. Liu ve ark., 2013; Luwor ve ark., 2013; Anonim, 2014b).

Beyin tümörlerinden glioblastomanın ve diğer tümör çeşitlerinin oluşma nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Araştırmacılar, tümör oluşumunda rol oynayan farklı kromozom genlerinde anormallikler tespit etmişler ve beyin tümör oluşumunun da bu anormalliklerden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Çevresel (elektromanyetik alanlar, pestisitler, nitröz bileşikler, virüsler ve diğer enfeksiyon ajanları, radyasyon, kafa travması ve beslenme alışkanlıkları), mesleki, ailesel ve kalıtsal faktörlerin bu anormalliklere sebep olabileceği öngörülse de esas sebepler ortaya çıkarılamamıştır (Farrell ve Plotkin, 2007; Bruce ve Kennedy, 2009; Karabağ ve ark., 2013; Urbańska ve ark., 2014).

Beyin tümörünün büyümesi ile beraber beynin normal fonksiyonları işlemez hale gelmektedir. Glioblastoma hastalığında tümörün gelişimi ile orantılı olarak beyine olan basınç artmaktadır. Bu basınç sonucunda oluşan ilk belirtiler baş ağrısı ve baş dönmesidir. Nöbet, hafıza kaybı ve davranış değişiklikleri hastalık ilerledikçe ortaya çıkan sorunlardır. Vücudun bir tarafında meydana gelen hareket veya duyu kaybı, konuşma bozukluğu, görme bozuklukları (bulanık görme, çift görme) ve bilişsel bozukluklar da yaygın olarak görülen glioblastoma belirtileridir. Diğer belirtiler de tümörün büyüklüğüne ve konumuna göre ortaya çıkabilmektedir (Goldlust ve ark., 2008; Anonim, 2014b; Urbańska ve ark., 2014).

Tüm kanser çeşitlerinde olduğu gibi beyin tümörlerinde de erken tanı büyük önem taşımaktadır. Glioblastoma teşhisinde en çok başvurulan yöntem manyetik rezonans görüntüleme (MRG) sistemidir. MRG ile alınan görüntülerde glioblastomanın genellikle halkasal bir lezyon şeklinde olduğu dikkat çekmektedir (Smirniotopoulos ve ark., 2007; Mayadağlı ve ark., 2013). Histolojik, sitolojik ve histokimyasal yöntemler kullanılarak tümörün tamamı veya bir kısmı üzerindeki histopatolojik incelemeler sonucunda kesin tanı gerçekleştirilmektedir (Urbańska ve ark., 2014). Manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) aracılığı ile gerçekleşen ölçümlerde tümördeki kimyasal özellikler ve mineral seviyesi tespit edilmek suretiyle tümörün malign veya benign olduğuna karar verilmektedir. Ayrıca MRS sayesinde bazı enfeksiyonların (tüberküloz, parazit, bakteri ve mantar), demiyelinizasyon olayının (beyin nöronlarındaki miyelin veya koruyucu kılıfın zarar görmesi) ve felç gibi diğer tıbbi sorunların beyin tümöründen ayırt edilmesi sağlanmaktadır (Anonim, 2014b).

Glioblastoma ile mücadelede uygulanacak olan tedavi metotları tümörün çeşidine, yayılımına, büyüklüğüne ve bulunduğu bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca hastanın genel ve nörolojik durumu da tedavi sürecini etkilemektedir (Urbańska ve ark., 2014). Glioblastoma ile mücadelede temel tedavi metotlarının başında cerrahi tedavi gelmektedir. Tümörün küçük olduğu durumlarda sıklıkla faydalanılan cerrahi yöntem, tümörün geniş bir bölgeye yayılması durumunda tam olarak istenilen sonucu vermemektedir. Bu durumda yine uygulanabilecek cerrahi yöntem sayesinde tümör sayısı azaltılarak hastanın yaşam kalitesini yükseltme amaçlanmaktadır (Goldlust ve ark., 2008; Bruce ve Kennedy, 2009). Cerrahi yöntem dışında hastanın sahip olduğu tümör dercesine göre, uygulanan kombine tedaviler aracılığı ile de tedavi süreci devam ettirilebilmektedir. Radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarının ayrı bir şekilde veya cerrahi yöntem ile beraber kombine bir şekilde gerçekleştirilmesi hastanın hayatta kalma süresini artırabilmektedir (Combs ve ark., 2005; Nieder ve ark., 2006; Gauden ve ark., 2009; Wang ve ark., 2010).

2.1.6. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavilerinde başarısızlığa götüren en önemli nedenlerin başında invazyon ve metastaz gelmektedir. Tanısı koyularak tedavisine başlanan birçok hastada klinik metastazın meydana geldiği, bazılarının ise lokal tedaviler aracılığı ile iyileştirilebildiği rapor edilmiştir. Ancak yapılan araştırmalar göstermektedir ki lokal tedavi ile sonuç alınıyor sanılsa da gizli metastazlar bir süre sonra ortaya çıkabilecek ve hasta yaşamını kaybedebilecektir (Mandel, 1998). Bu özelliğinden dolayı sinsi bir hastalık olan kanserden korunmada en önemli husus, kanserin oluşmadan önlenmesi için gerekli tedbirlerin alınmasıdır. Karsinojenik maddelerden uzak durmak, yaşımıza uygun olarak yeterli ve dengeli beslenmek ve ruh sağlığımızı güçlü tutmak suretiyle temiz ve sağlıklı bir yaşam sürdürmeye çalışmamız kansere yakalanmama ihtimalimizi yükseltecektir (Göbelez, 2001; Usta, 2008).

Kanser hastalığına yakalanmış biri için erken tanı büyük önem arz etmektedir (Hatipoğlu, 2007; Bilge, 2008; Kanbur ve Çapık, 2011). Erken tanı koyulmuş bir hastanın uygun tedavi yöntemleri kullanılarak %70-100 oranında kanserden kurtulma ihtimali mevcuttur (Bilge, 2008). Ancak kanserin seviyesinin ilerlemesi, hastayı uzun ve zorlu bir tedavi sürecine itebilmektedir. Bu süreç içerisinde hasta üzerinde *küratif (iyileştirici)* veya *palyatif (geçiştirici)* tedavi yöntemleri tercih edilmektedir (Dökmeci, 2000).

Kanser tedavisinde yararlanılan yöntemler genel olarak; cerrahi tedavi, radyoterapi (ışın tedavisi), kemoterapi (ilaç tedavisi), hormonal tedavi, immünoterapi ve ağrı tedavisi olmak üzere altı ana başlık altında incelenmektedir (Usta, 2008). Ayrıca bu temel yöntemlere destek amaçlı gerçekleştirilen *tamamlayıcı tedavi metotları* ve bilimsel tıbbi uygulamalar altında geçmeyen, geleneksel tedavi yöntemleri olarak da bilinen *alternatif tedavi metotları* da mevcuttur (Kav ve ark., 2008; Işık ve Akçay, 2014).

2.1.6.1. Cerrahi Tedavi

Kanser tedavisinde en köklü yöntem olan cerrahi müdahalede amaç, tümörün yayılmış olduğu tüm dokuyu kökünden kesip almaktır. Tümörün lenf bezlerine dağılmış olduğu durumlarda, ilerleyen süreçte riski azaltmak adına, doku lenf bezleriyle beraber de alınabilmektedir (Derman, 1998; Usta, 2008). Primer tümörün meydana gelip metastaz yapmadığı durumlarda ilk tercih edilen yöntem cerrahi müdahaledir. Tümörlü dokunun tamamen çıkarılması küratif tedavi yöntemlerine girmektedir. Bazı durumlarda ise diğer tedavi yöntemlerine katkı sağlanması amacıyla tümörlü kitlenin tamamen alınması yerine azaltılması da söz konusu olabilir. Bu tedavi yöntemi ise palyatif metot başlığı altındadır (Kutluk ve Kars, 1994; Derman, 1998).

Cerrahi tedavi yönteminde büyük ameliyatların haricinde daha küçük cerrahi tekniklerden de yararlanılmaktadır. *Lazer destekli interstisyel termoterapi (LITT)*, *yüksek frekanslı termoterapi (HITT)*, *radyofrekansablasyon*, *kriyoterapi* ve *fotodinamik lazer* teknikleri minimal cerrahi müdahalelerdir. LITT, HITT ve radyofrekansablasyon tekniklerinde kanserli organın küçük bir kesiginden içeri girerek tümör dokusunu ısı, elektrik ve lazer aracılığı ile tahrip edebilme söz konusudur. Kriyoterapide tümörlü dokunun tahrip edilmesi ani dondurma, yavaş eritme veya soğuk-sıcak uygulamanın dönüşümlü olarak uygulanması esasına dayanmaktadır. Fotodinamik lazer tedavisinde ise amaç, kan dolaşım sistemine enjekte edilen ışığa duyarlı maddelerin tümör dokusunda yoğunlaşmasını sağlamak ve bu yoğunlaşmanın ardından tümörün belli bir ışın dalgasıyla ışınlamaya maruz bırakılarak tahrip edilmesidir. Tabi ki bu yöntemlerin hepsi olumlu sonuçlar verse de yan etkileri de göz ardı edilmemelidir (Usta, 2008).

2.1.6.2. Radyoterapi

Radyoterapi ile tedavi sürecinde, gama, kobalt ve sezyum gibi güçlü enerjiye sahip elektromanyetik ışınlar ile sonuç alınması amaçlanmaktadır. Bu tedavi yöntemi ile en iyi sonuç alınan bölge doku yüzeyidir. Doku yüzeyinde yer alan tümörler ışınlar ile daha çabuk temas etmekte ve diğer organların zarar görme ihtimali düşmektedir. Organlarda yer alan tümör tedavilerinde vücuda gönderilen ışının enerjisi artırılarak

hedef organa iletilmesi sağlanmaktadır. Bazı durumlarda az miktarda radyoaktif maddeyi uzun süre kullanmak amacıyla elektromanyetik ışın, doğrudan tümöre (brakiterapi) veya tümörün çok yakın bir bölgesine konumlandırılabilir. Her hücrenin elektromanyetik ışınlara direnci farklı olduğundan ve sağlam dokunun zarar görmesini engellemek amacıyla radyoterapi yöntemi, cerrahi tedavi veya kemoterapi yöntemleri ile beraber kullanılabilir gibi tüm bu yöntemler birbirlerini takip etmek suretiyle ayrı ayrı da kullanılabilir (Kutluk ve Kars, 1994; Derman, 1998; Usta, 2008).

2.1.6.3. Kemoterapi

Erken tanının yapılmadığı ve metastaz yapmış olan kanser türlerinde ağırlıklı olarak tercih edilen yöntem kemoterapidir (Kutluk ve Kars, 1994). Kemoterapi yönteminde, farklı maddeleri içeren ilaçların (kemoterapötik maddeler) kullanımı ile kanserli hücrelerin bölünmesini engellemek veya geciktirmek amaçlanmaktadır. Kullanılan ilacın tümörü etkileyip etkilemediği hasta üzerinde sürekli analizler yapılmak suretiyle anlaşılabilir. Tedavi kürlerinin birkaç kez kullanılması sonucunda hücrelerin bu ilaca karşı bağışıklık kazanmış olma ihtimali mevcuttur. Bu ihtimal göz önünde bulundurularak genellikle farklı ilaçlar ile kombine tedaviler tercih edilmektedir (Usta, 2008). Kullanılan bu ilaç gruplarından bazıları hücrenin genetik kodunu değişime uğratmak (alkilleyici ajanlar), bir kısmı DNA replikasyonunu engellemek (antimetabolik ajanlar), diğer bir kısmı ise hücrenin bölünmesini durdurmak suretiyle tedavi sağlamaktadır (Evinç ve ark., 1998; Dökmeci, 2000). Kemoterapinin sistematik bir tedavi yöntemi olduğu düşünüldüğünde, saptanmış veya saptanamayan, ister benign isterse malign tümör çeşitlerinde etkili olabildiği belirlenmiştir. Fakat bu geniş çaplı etkisinden dolayı sağlıklı hücreleri de olumsuz yönde etkilediği ortaya çıkmıştır. Saç dökülmesi, bulantı, kusma, akyuvar sayısında düşme gibi belirtiler kemoterapinin yan etkilerinden bazılarıdır (Kutluk ve Kars, 1994; Usta, 2008).

2.1.6.4. Hormonal Tedavi

Hormonlar, bazı hücreler tarafından vücuttaki diğer hücrelerin aktivitelerini düzenlemek amacıyla salgılanan organik bileşiklerdir. Bu bileşikler vücuttaki su ve mineral dengesini ve homeostasiyi sağlayarak, dış uyarılara cevap oluşturarak metabolizmayı düzenlemek suretiyle büyümeyi, gelişmeyi ve üremeyi kontrol etmektedir. Vücutta birçok farklı hormon salgılanmasına rağmen her hormonun etkilediği hedef hücreler mevcuttur (Johnson ve Raven, 2004b; Postlethwait ve Hopson, 2006c).

Bazı kanser türlerinde, salgılanan hormonların kanserli hücre oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir (Russo ve Russo, 2008; LeRoith, 2011; Lange, 2012; Perry ve ark., 2013). Bu nedenle kansere neden olduğu düşünülen bu hormonların cerrahi olarak veya özel ilaçlar kullanılarak bloke edilmesi yönünde tedavi metotları geliştirilmiştir. Kanserle mücadelede hormonal tedavi sürecinde hastaya antihormonal maddeler verilmektedir. Bu madde iletimi ağız veya kan yolu ile olmaktadır. Hormonal tedavi yönteminin eleştirildiği yönü, vücudun doğal hormonal dengesini bozduğundan dolayı kişilerin hayat kalitesini düşürmesidir (Usta, 2008).

2.1.6.5. İmmünoterapi

Vücudun bağışıklık sistemini güçlendirmeye yönelik gerçekleştirilen tedavi yöntemi immünoterapi adını almaktadır (Serdengeçti, 1998). Bağışıklık sisteminin zayıflamasına veya çökmesine neden olan hastalık türlerinin kanseri oluşturma riski daha yüksektir. Bu nedenle immünoterapi sayesinde bağışıklık sistemi içerisindeki hücrelerin kanser hücrelerini hedef alarak yok etmesi sağlanmaktadır. İmmünoterapi yönteminde kullanılan protein yapılı iki önemli molekül *sitokin* ve *antikordur* (Usta, 2008; Şakalar ve ark., 2013).

Sitokin bağışıklık sistemi uyarıcılarındandır. İnterferon, interlökin ve eritroprotein gibi sitokin grubu altında yer alan maddelerin temel görevi antikör ve kan üretimini sağlamaktır. Bu temel görevlerin haricinde sitokinler kanser hastalarında kanserli hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını da kolaylaştırmaktadır. Sitokin

tadevisinde kullanılan maddeler genellikle kemoterapi yöntemi ile beraber damardan veya deri altından uygulanmaktadır. Dışarıdan vücuda ilave edilen sitokin miktarının uygun dozda ayarlanmaması durumunda kan dolaşımı bozukluklarına rastlanabilir. Bu yüzden sitokin tedavisinde en uygun yol vücudun kendisinin sitokinleri üretmesini sağlayabilmektir. Bu mekanizmayı harekete geçirmek amacıyla sitokin üretimini teşvik edecek bitkisel ve hayvansal kaynaklı ürünlerden faydalanılmaktadır (Derman, 1998; Serdengeçti, 1998; Usta, 2008).

Antikor tedavisinde, monoklonal antikor ismi verilen yapay antikorlardan kanserli hücreleri tanı amacıyla yararlanılmaktadır. Bu antikorlar tümör hücrelerinin yüzey antijenlerin ile reaksiyon göstermektedir. Bir nevi spesifik tümör tanıyıcılarıdır. Bu özelliğinden dolayı monoklonal antikorları radyoaktif maddelere bağlayarak görülmeyen tümör ve metastaz yerlerini saptamak mümkündür. Ayrıca bu antikorlara sitotoksik maddeler bağlamak suretiyle yine yönlendirme amaçlı kullanılarak doğrudan tümör hücreleri üzerinde toksik etki oluşturmak da bir diğer monoklonal antikor tedavi yöntemidir (Serdengeçti, 1998; Demirelli, 2005; Şakalar ve ark., 2013).

2.1.6.6. Ağrı Tedavisi

Kanser hastalığının seyri ve tedavisi esnasında ortaya çıkabilecek ağrılardan kurtulmak veya bu ağrıların şiddetini azaltmak amacıyla gerçekleştirilen tedavi yöntemleri ağrı tedavisi başlığı altında incelenmektedir. İlk olarak 1982 yılında WHO tarafından gerçekleştirilen ve alanında uzman birçok bilim insanının katıldığı toplantıda kanserde ağrı tedavisinin esasları saptanmıştır. Ayrıca bu toplantıda ağrı kesmede etkili olacak bazı ilaçlar üzerinde anlaşmaya varılmıştır. O tarihten günümüze kadar yine belirli aralıklarla gerçekleştirilen bilimsel toplantılar aracılığı ile farklı ağrı tedavi metotları üzerinde sonuçlara varılmaktadır (Erdine, 1992).

Kanserde ağrı tedavisinde önemli başlıklardan birisi palyatif bakımdır. Palyatif bakımda küratif tedaviye cevap vermeyen hastaların yaşam kalitesini artırmak amacıyla ağrıların, ruhsal ve psikososyal sorunların erken tespiti sağlanarak bu sorunların önlenmesi, giderilmesi veya azaltılması amaçlanmaktadır. Palyatif bakım, hastalığın başlangıç

döneminden itibaren diğer tedavi yöntemleri ile beraber uygulandığında, ağrıların kökenine inilerek tümörün lokalitesi hakkında da fikir yürütmek suretiyle farklı tedavi metotları geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (Erdine, 1992; Göbelez, 2001; Usta, 2008).

2.1.6.7. Tamamlayıcı ve Alternatif Tedaviler

Kanser hastalığının tedavi sürecinde modern tedavi metotları istenilen sonucu tam olarak vermediğinde destek amaçlı birçok tamamlayıcı tedavi yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Tamamlayıcı tedavi metotlarında amaç, hastadaki semptomları ve kullanılan kemoterapötiklerin yan etkilerini düşürmek, fiziksel ve ruhsal destek sağlamak suretiyle kişinin yaşam kalitesini geliştirmektir (Kav ve ark., 2008).

Tamamlayıcı tedavi metotları içerisinde zihinsel, ruhsal ve bedensel tedavi metotları başlığı altında; aromaterapi masajı, biyoenerji, spiritüel şifa (maneviyat ve dua), holistik tıp (bütüncül tıp), hipnoz, meditasyon, yoga ve psikoterapi yöntemleri, fiziksel dokunma ve enerji tedavileri başlığı altında ise akupressör, akupunktur ve bodywork yöntemleri yer almaktadır (Işık ve Akçay, 2014). Yine tamamlayıcı tedavi yöntemlerinden olan organot terapi, hipertermi (aşırı ısı yöntemi) tedavi, oksijen terapi, ozon terapi, kolon hidroterapi, galvanoterapi (pil akımı tedavisi) ve yer ışınları ile tedavi metotları diğer kullanım alanlarını oluşturmaktadır (Usta, 2008).

Alternatif kanser tedavisi yöntemlerinde kullanılan başlıca ürünler bitkisel kaynaklıdır ve kullanılan tıbbi bitkiler sayesinde gerçekleştirilen tedavi süreci *fitoterapi* adını almaktadır. Bitkisel ürünlerin tedavi amaçlı kullanımı M.Ö. 3000 yıllarına kadar dayanmaktadır. WHO kayıtlarına göre, temel sağlık hizmetleri uygulamalarında dünya nüfusunun %70-80'i bitkisel ürünlerden faydalanmaktadır (Anonim, 2012). Geçmişten günümüze kanser hastalığına çözüm bulmak amacıyla sayısız bitki türü tedavi amaçlı olarak denenmiştir. Ökseotu, ekinezya, ginseng, taiga kökü, meryemana dikeni, arpa, yeşil çay, lapako çayı, rooibos çayı, essiak çayı, buhur ve hint keneviri geleneksel olarak halkın yararlandığı bitki çeşitlerinin başında gelmektedir (Usta, 2008). Farklı bitkilerden elde edilen ekstraktların ve çeşitli etken maddelerin bazı kanser türleri üzerinde, temel tedavi metotlarına destek amaçlı olarak kullanıldıkları ve olumlu sonuç

verdikleri yapılan bilimsel çalışmalara da yansımıştır (Efdi ve ark., 2007; Shen ve ark., 2007; Ayhan, 2008; Karaca, 2008; Er, 2010; Russo ve ark., 2010; Efferth ve ark., 2011; Tomsuk, 2011; Sırma, 2013).

2.1.7. Alternatif Tedavi Amaçlı Kullanılan Likenlerin Genel Özellikleri

Varlığının 400 milyon yıl öncesine dayandığı bilinen likenlerin (Taylor ve ark., 1995) eski çağlarda tek bir bitki olduğu sanılmasına rağmen, Schwender ve Trebox yaptığı çalışmalar ile likenleri mantarlar ve alglerin birleşmesi sonucu morfolojik ve fizyolojik bir bütün halinde meydana getirdikleri simbiyotik organizmalar olarak tanımlamışlardır (Aslan, 1995). Morfoloji ve fonksiyon açısından kendisini meydana getiren alg ve mantarlardan farklı bir özellik barındıran likenlerde tallus adı verilen, mantar hücreleri arasına alg hücrelerinin yerleşimi sonucu oluşmuş yapılar mevcuttur. Likenlerde vejetatif üreme biçimi talluslardan meydana gelen üreme birimleri (soredyum) ile gerçekleşirken, eşeyli üreme mantar üyelerinde görülmektedir. Büyük bir kısmı tallustan meydana gelen likenlerin rengi, boyutu veya şekli tanımlanırken tallusu kastedilmektedir (Aslan, 1995; Brodo ve ark., 2001).

Liken birliği içerisinde yer alan alglerin ve mantarların, bu birlikteliği ayakta tutabilmek adına kendilerine özgü fonksiyonları mevcuttur. Simbiyotik ilişkide, alg grubu klorofil içerdiğinden fotosentezi gerçekleştirerek birliğin karbonhidrat gereksinimini karşılarken, mantar grubu su ve madensel maddelerin alınmasından sorumludur. Bu iki canlı grubunun normal şartlarda bireysel olarak yaşayamayacakları bölgelerde birleşerek likenleri meydana getirmek suretiyle koloni halinde yaşadıkları bilinmektedir (Nash, 2008).

Yeryüzünde diğer bitkilerin yaşayamadıkları verimsiz topraklar üzerinde, çok soğuk alanlarda, çöllerde, kuru ağaç kabukları üzerinde yani hemen her bölgede likenlere rastlamak mümkündür. İndikatör canlı olarak da bilinen likenlerin yeterli nem ve ışık oranının bulunduğu, oksijeni bol, temiz alanlarda daha uzun ömürlü oldukları ve bu bölgelerde diğer alanlara kıyasla daha fazla liken türünün gelişebildiği tespit edilmiştir (Brodo ve ark., 2001).

Doğada kabuksu, yapraksı veya dalsı formlarda bulunabilen likenler, yaşamlarının ilk dönemlerinde hiçbir bitki türünün yaşayamayacağı ortamlarda (kayalık, bataklık, çakıllı vs.) primer süksesyon olayını meydana getirmektedir. Yapısında barındırdığı asidik içerikli sekonder metabolitler aracılığı ile tutundukları kayaları parçalayarak kaya üzerinde ince bir toprak tabakası oluşturan likenler, ilerleyen dönemlerde yüksek yapılı bitkilerin o bölgede gelişmesine olanak sağlamaktadır (Nash, 2008). Likenlerin primer süksesyonda görevli olan sekonder metabolitleri birçok bilim insanında likenlerden farklı alanlarda yararlanma fikrini doğurmuştur. Likenlerin kimyası üzerine ilk çalışmalar 19. yüzyılın ortalarında oluşmaya başlamış ve o dönemden günümüze kadar birçok araştırmacı likenlerin yapısında bulunan primer (polisakkaritler, aminoasitler, amin ve proteinler) ve sekonder (alifatik ve aromatik bileşenler) metabolitlerin kimyasal yapılarını aydınlatarak, bu bileşiklerin farklı alanlarda kullanılmasına öncülük etmiştir (Huneck, 1999; Boustie ve Grube, 2005).

Cetraria islandica (L.) Ach., *Cladina rangiferina* (L.) Nyl. ve *Lecanora esculenta* (Pall.) Eversm. türlerinin eski dönemlerde gıda amaçlı, *C. islandica* ve *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. türlerinin deri tabaklanması alanında, *Rocella* sp. türlerinin kıyafet boyama alanında, *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf., *L. pulmonaria*, *Anaptychia ciliaris* (L.) Körb., bazı *Usnea* sp. ve *Physcia* sp. türlerinin ise kozmetik alanında kullanıldıkları belirlenmiştir (Öztürk ve Aslan, 1991; Dilsizoglu ve ark., 2004).

Likenlerin yapılarındaki etken maddelerin toksik ve faydalı özellikleri göz önüne alınarak gerçekleştirilen birçok çalışma ile bilim dünyasına katkı sağlanmıştır. Tarım zararlıları ile mücadelede gerçekleştirilen biyolojik insektisit çalışmaları (Emsen ve ark., 2012a, 2012b, 2013; Yildirim ve ark., 2012a, 2012b), tıp ve sağlık sektöründe alternatif metot olarak ortaya konulan antimikrobiyal (Ranković ve ark., 2011; Kosanić ve ark., 2013; Grujić ve ark., 2014) antiviral (Karagöz ve Aslan, 2005), antiinflamatuvar (Süleyman ve ark., 2003; Halici ve ark., 2005; Odabasoglu ve ark., 2006), antioksidan (Aslan ve ark., 2006; Yücel ve ark., 2007; Ranković ve ark., 2012; Grujić ve ark., 2014; Kosanić ve ark., 2014), antialerjen (Huneck, 1999; Kirmizigul ve ark., 2007), immünolojik (Ögmundsdóttir ve ark., 1998; Kirmizigul ve ark., 2007), antigenotoksik ve antimitojenik (Agar ve ark., 2010; Turkez ve ark., 2010; Alpsoy ve

ark., 2011; Kotan ve ark., 2011; Aslan ve ark., 2012) çalışmalar, fikir oluşturmaları açısından, daha sonraki dönemlerde yapılabilecek ayrıntılı çalışmalara ışık tutmuştur.

Tıbbın ve sağlık sektörünün değişik alanlarında alternatif tedavi metotları kapsamında etkili sonuçlar verdiği gözlemlenen likenlerin, farklı kanser türleri üzerinde alternatif tedavi süreci içerisinde etkili olabileceğini kanıtlayan birçok bilimsel yayın mevcuttur (Bézivin ve ark., 2004; Haraldsdóttir ve ark., 2004; Bazin ve ark., 2008; Burlando ve ark., 2009; O'Neill ve ark., 2010; Einarisdóttir ve ark., 2010; Koparal ve ark., 2010; Bačkorová ve ark., 2011; Mitrović ve ark., 2011; Ranković ve ark., 2012; Turkez ve ark., 2012; Singh ve ark., 2013; Kosanić ve ark., 2013; Ari ve ark., 2014b; Grujić ve ark., 2014). Bu yayınlar ve geçmiş yüzyıllardan bu yana likenlerin geleneksel bir şekilde kullanılarak birçok alanda olumlu sonuçlar verdiği göz önüne alındığında, kanser ile mücadelede de temel tedavi metotlarına destek amaçlı likenlerin kullanımının ayrı bir öneme sahip olduğu göz ardı edilemez bir gerçektir.

2.2. Kaynak Araştırması

Lin ve ark. (2003), *Cladonia furcata* likeninden izole ettikleri polisakkaritlerin (CFP-2) HL-60 ve K562 hücre hatları üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. CFP-2'nin antiproliferatif özelliklerinin apoptotik hücre ölümünün indüklenmesine bağlı olduğu görülmüştür. Apoptoz sırasındaki moleküler değişimleri aydınlığa kavuşturmak adına HL-60 hücrelerindeki özel antikolar kullanılarak Western Blot yöntemi ile Bcl-2, Bax, Fas ve FasL protein ekspresyon ölçümleri alınmıştır. Bcl-2 seviyesinin büyük ölçüde değişmeden kaldığı, fakat Bax, Fas ve FasL ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Dahası, CFP-2 uygulanmış HL-60 hücrelerindeki telomeraz aktivitesinin, üzerinde uygulama gerçekleştirilmeyen kontrol hücrelerine kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar CFP-2'nin potansiyel kanser tedavi aracı olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

Bézivin ve ark. (2004), *Cladonia convoluta* liken türünden izole edilen depsidon 9'-(O-metil) protosetrarik, (-)-usnik ve fumarprotosetrarik asidin yapılarını HSQC ve HMBC spektral verilerini kullanılarak açığa çıkarmışlardır. Kullanılan bileşiklerden yalnızca (-)-usnik asidin çeşitli kanserli hücre hatları üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği

belirlenmiştir. L1210, 3LL, DU145, MCF7, K-562 ve U251 hücre hatları üzerindeki medyan inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerlerinin sırasıyla 6; 12,1; 15,8; 17,8; 8,2 ve 6,8 $\mu\text{g/mL}$ olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, (-)-usnik asidin doza ve zamana bağlı bir şekilde fare lösemi hücre hattı olan L1210 üzerinde apoptozu teşvik ettiği belirlenmiştir.

Correcché ve ark. (2004), likenlerden izole ettikleri 15 sekonder metabolitin (depsidler, depsidonlar ve usnik asit) primer sıçan hepatosit kültürü üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemiştir. Laktat dehidrogenaz salınımı, kaspaz 3 aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Önemli bir nekroz gerçekleşmeden önce hepatositler üzerinde apoptotik etkileri olan bileşikler tespit etmek için, apoptoz gerçekleştirme fazında önemli adımlar ile ilişkili bir dizi markör değerlendirildi. DNA fragmentasyonunun akım sitometri analizi, hepatositlerin sitotoksik bileşik konsantrasyonlarına maruz kalmasının ardından alt-diploid DNA içeriği ile apoptotik çekirdeklerde artışın olduğunu ortaya koymuştur.

Haraldsdóttir ve ark. (2004), liken sekonder metabolitlerinden protolikesterinik asit, lobarik asit ve baemycesic asidin 12 farklı insan kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini araştırmışlardır. Tüm bileşiklerin *in vitro* şartlarda 5-LOX inhibitör aktiviteleri ve ayrıca protolikesterinik ve lobarik asidin 12-LOX inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan kanser hücre hatları şunlardır: Capan-1, Capan-2 ve PANC-1 (hepsi pankreastan), T47-D (meme), PC-3 (prostat), NCI-H1417 (akciğer), NIH:OVCAR-3 (yumurtalık), AGS (mide), WiDr (kolon), HL-60, K-562 ve JURKAT (eritrosit ve T-hücre lösemisi). Protolikesterinik asidin tüm hücre hatlarına karşı çok yüksek derecede inhibitör etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Daha sonraki etkili metabolitin 15,2-65,5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik medyan etkili konsantrasyon (EC_{50}) değeri ile lobarik asit olduğu tespit edilmiştir.

Halici ve ark. (2005), *Usnea longissima* liken türünden elde edilen su ekstraktının sıçanlardaki indometazin-tesirli ülser modelleri kullanılarak antiülserojenik etkilerini araştırmışlardır. Deneme grupları altı sıçandan oluşturulmuştur. Su ekstraktının 50, 100 ve 200 mg/kg dozlu antiülserojenik aktiviteleri negatif (yalnızca indometazin kullanılmış) ve pozitif kontrol grupları ile kıyaslanarak belirlenmiştir. *U. longissima* türünün su ekstraktının tüm dozlarının negatif kontrol gruplarına kıyasla önemli

derecede antiülserojenik aktivite gösterdiği belirlenmesine rağmen, en yüksek aktiviteyi %79,8 ile 100 mg/kg'lık ekstrakt göstermiştir. Kullanılan su ekstraktı pozitif antioksidan olarak kullanılan askorbik asit ve troluks ile karşılaştırıldığında daha az seviyede antioksidan aktivite göstermiştir.

Mayer ve ark. (2005), insan tümörlerinin çoğunluğunun, p53 ağı aktivitesini ve ekspresyonunu düzenleyen inaktif p53'ü veya hücrel faktörleri taşıdığını bildirmişlerdir. Gerçekleştirilen çalışmada, bir liken bileşiği olan usnik asidin p53 meme kanseri hücre hattı olan MCF7'ye, fonksiyonel olmayan p53 meme kanser hücre hattı olan MDA-MB-231'e ve akciğer kanseri hücre hattı olan H1299'a karşı aktivitesi incelenmiştir. Usnik asit ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde p53 ve p21 protein birikimi olmasına rağmen, p53 transkripsiyonel aktivitesi etkilenmemiştir. Ayrıca Ser15'te, p53 fosforilasyonunun olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, usnik asidin oksidatif stres nedeniyle hücrelerin normal metabolik sürecini bozduğunu, fakat DNA hasarının gerçekleşmediğini ortaya koymuştur.

Cheng ve ark. (2006), glioblastomanın nörolojik sistemde en yaygın görülen malign tümör olduğunu öne sürmüşlerdir. Gerçekleştirilen çalışmada, *Bolbostemma paniculatum*'un tuberlerinden tubeimosid V (1)'in farklı konsantrasyonlarının U87MG hücreleri üzerindeki antitümör aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar, U87MG hücre proliferasyonunun doz ve zamana bağlı olarak baskılandığını göstermiştir ($IC_{50} = 3,6 \mu M$). U87MG hücrelerindeki DNA akım sitometri analizleri, tubeimosid V (1)'in apoptoz hücre döngüsündeki belirgin alt-G1 pikinin indüklendiğini ortaya çıkarmıştır. Western-blot yöntemi ile incelenen moleküler değişimler, tubeimosid V (1)'in Bcl-2 proteininin ekspresyon seviyesini düşürdüğünü, Bax proteininin ekspresyon seviyesini ise yükselttiğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, tubeimosid V (1)'in U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin hücre apoptoz indüklenmesinden kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır.

Das ve ark. (2007), sarımsakta bulunan dialil sülfid (DAS), dialil disülfür (DADS) ve dialil trisülfid (DATS) organosülfür bileşiklerinin insan glioblastoma T98G ve U87MG hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Wright ve ApopTag boyama uygulamaları apoptozun indüklendiğini göstermiştir. Ölçümler, reaktif oksijen

türlerinin (ROS) ve hücre içi serbest $[Ca^{2+}]$ artışının apoptozu meydana getirdiğini ispatlamıştır. Western blot analizi, stres kinazlar ve sistein proteazların artan ekspresyon ve aktivitelerinin apoptoza neden olduğunu göstermiştir. Spesifik inhibitör kullanımı apoptozdaki farklı kinaz ve proteinaz aktivasyonunu ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak, sarımsak bileşenlerinin ROS üretimine, endoplazmik retikulum stres artışına, stres kinaz ve sistein proteazların aktivasyonundaki azalmaya sebep olduklarından dolayı glioblastoma hücrelerindeki apoptozu indükledikleri tespit edilmiştir.

Bazin ve ark. (2008), dokuz usnik asit-amin bileşimini fare ve insan kanserli hücre hatları üzerinde denemişlerdir. Poliamin türevleri L1210 hücre hattında önemli derecede sitotoksikite göstermiştir. Bu türevlerin aktiviteleri poliamin geçiş sisteminin (PTS) bağımsız olduğunu ortaya çıkarmıştır. Gerçekte poliamin türevlerinin aktiviteleri Çin hamster ovaryumu (CHO) ve PTS'nin olmadığını CHO-MG hücrelerinde birbirlerine benzer olduğunu göstermiştir. Ek olarak, PTS'nin aktivitesini dolaylı yoldan artırdığı ve sonuçta PTS aracılığıyla hücelere giren sitotoksik ilaçların sitotoksikitesini yükselttiği bilinen alfa-diflormetilornitin ve ornitin dekarboksilaz inhibitörü, poliamin türevlerinin aktivitesi üzerinde etki göstermemiştir. Daha aktif olan 1,8-diaminoktan türevi çalışılan tüm kanser hücre hatları üzerinde benzer aktiviteleri göstermiş ve apoptoz olayını teşvik etmiştir.

Kim ve ark. (2008), bir izoflavon metaboliti olan irisolidonun insan astroglioma hücrelerindeki (U87MG) matris metaloproteinaz-9 (MMP-9) ekspresyonunu inhibe edip etmediğini incelemişlerdir. İrisolidon, U87MG hücrelerindeki PMA tarafından indüklenen MMP-9'un protein ekspresyonunu ve salgısını inhibe etmiştir. Çalışmada irisolidonun glioma hücrelerinin *in vitro* invazivliğini bastırdığı gözlenmiştir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar, irisolidon tarafından gerçekleştirilen MMP-9 ekspresyonunun güçlü inhibisyonunun, glioma invazivliğinin ve gelişiminin kontrolü için uygulanabilecek bir tedavi yöntemi olabileceğini göstermiştir.

Russo ve ark. (2008), UV-A ve UV-B'nin gen mutasyonlarına sebep olarak bağışıklık sistemini baskıladığını ve deri kanserine yol açtığını öne sürmüşlerdir. UV-A ve UV-B tarafından üretilen reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot (RNS) türlerinin inhibisyonu sayesinde inflamasyon, bağışıklık sistemini bastırma, gen mutasyonu ve karsinogeneze

çözüm bulunabileceğini düşünmektedirler. Bu düşüncelerden yola çıkarak yapılan çalışmada, iki liken bileşiği olan sphaerophorin (depside) ve pannarin (depsidone)'in, hidroksil radikalleri ($\cdot\text{OH}$), nitrik oksit (NO) ve bunların süperoksit anyon (O_2^-) tarama kapasitesi tarafından indüklenen pBR322 DNA bölünmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, bu bileşiklerin M14 (melanom hücre hattı) üzerindeki antiproliferatif aktiviteleri de incelenmiştir. Çalışma sonucunda Sphaerophorin ve pannarin bileşiklerinin plazmit DNA üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Hücre kültüründe elde edilen verilere göre, bu liken metabolitlerinin apoptotik hücre ölümünü teşvik etmek suretiyle melanom hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği görülmüştür. Bu inhibasyon, genomik DNA parçalanması (COMET ve TUNEL uygulamaları) ve kaspaz-3 aktivitesindeki önemli artış gözlemlenerek tespit edilmiştir.

Zeytinoglu ve ark. (2008), *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarında 4-nitro-o-fenilendiamin (4-NPD) ve 2-aminofluorene (2-AF) olarak bilinen mutajenlere karşı antibakteriyal ajan olduğu tespit edilen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. likeninden elde edilen ekstraktın genotoksik/antigenotoksik aktivitelerini incelemiştir. Ayrıca mikronükleus oluşumu için mitomisin C'ye karşı ekstraktın daha ileri genotoksisitesi/antigenotoksisitesi insan lenfositlerinde değerlendirilmiştir. Bu denemelere ek olarak üç farklı hücre hattı üzerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) uygulaması sayesinde sitotoksik etkiler araştırılmıştır. Çalışma sonucunda *C. aculeata* ekstraktının bakteriyal sistemde antigenotoksik etki gösterirken, memeli hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği, bazı kanser hatlarında sitotoksisiteye sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar *C. aculeata* likeninin tedavi amaçlı kullanılabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

Burlando ve ark. (2009), liken poliketitlerinden (+)-usnik, salazinik, vulpinik, giroporik ve evernik asidin yara iyileştirici veya hücre çoğalması üzerine etkilerini araştırmışlardır. Denemeler MM98 kötü huylu mezotelyum hücreleri, A431 vulvaya ait kanser hücreleri ve HaCaT keratinositler üzerinde gerçekleştirilmiştir. NRU ve CV sitotoksisite uygulamalarının (+)-usnik asit için yüksek, vulpinik asit için orta seviyede ve salazinik, giroporik ve evernik asit için düşük seviyede toksisite gösterdiği ortaya çıkmıştır.

Deng ve ark. (2009), tıbbi bir mantar olan *Antrodia camphorate*'den izole edilen dehidroeburikoik asit (DeEA)'in glioblastomaya karşı sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür ve laktat dehidrogenaz salınım uygulamaları, DeEA'nın glioblastoma hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini belirlemiştir. Ayrıca anneksin V ve propidyum iyodür boyanma uygulaması, DeEA denemesinin nekrotik/geç apoptotik fraksiyondaki glioblastomaların hızlı bir şekilde artışına neden olduğunu göstermiştir. Oysa ki hücre döngüsü analizleri, DeEA'nın, alt-G1 fraksiyonunda bulunan U87MG hücre popülasyonunu artırmada başarısız olduğunu ortaya çıkarmıştır. DeEA hücre içi Ca^{2+} artışını tetiklemiş ve DeEA indüklü hücre ölümü BAPTA-AM tarafından önemli derecede azaltılmıştır. Bütün bu sonuçlar DeEA'nın nekrotik hücre ölümünü teşvik ettiğini ortaya çıkarmıştır.

Einarsdóttir ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada bir liken bileşiği olan usnik asidin kanserojen etkisinin, meme kanser hücre hattı (T-47D) ve pankreas kanseri hücre hattı (Capan-2) üzerindeki olası mekanizmalarını araştırmışlardır. *Cladonia arbuscula*'dan izole edilen (+)-usnik asit ve *Alectoria ochroleuca*'dan izole edilen (-)-usnik asit T-47D hücre hattına karşı DNA sentezi inhibitöründe sırasıyla 4,2 $\mu\text{g/mL}$ ve 4,0 $\mu\text{g/mL}$ 'lik IC_{50} değeri ile eşit etki gösterirken, Capan-2 hücre hattına karşı sırasıyla 5,3 $\mu\text{g/mL}$ ve 5,0 $\mu\text{g/mL}$ 'lik IC_{50} değerini ortaya çıkarmıştır. Sitometrik analiz akışı S fazına geçişin inhibe edildiğini doğrulamış ve hücre boyutunda azalma olduğunu göstermiştir. Hücrenin hayatta kalması düşük seviyede etkilenmiş; geç nekroz olayı hücre hatlarının birinde görülmüştür. İki enantiyomer arasında farklılık kaydedilmemiştir.

Hahm ve ark. (2010), *Opuntia humifusa*'nın hekzan, etil asetat ve su ekstraktlarının U87MG glioblastoma hücrelerindeki apoptoz, G1 tutuklaması ve proliferasyon üzerindeki etkilerini incelemiştir. Glioblastoma hücrelerindeki proliferasyonu MTT uygulaması ile belirlenmiştir. Ekstraktların apoptoz ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri akım sitometri aracılığı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, hekzan ve su ekstraktlarına maruz kalan U87MG hücrelerinin konsantrasyona ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığını göstermiştir. Ayrıca su ekstraktının, U87MG hücrelerindeki ROS üretiminde sağladığı artışın yanı sıra G1 tutuklamasını ve apoptotik olmayan hücre ölümünü de indüklediği ortaya çıkmıştır.

Jung ve Ghil (2010), *Torilis japonica* ekstraktının U87MG insan glioblastoma hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. MTT uygulaması sayesinde doza ve zamana bağlı olarak ekstraktın hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Ekstraktın, S-fazı hücre döngüsü tutuklamasını indüklediği ve siklin A, siklin bağlı protein kinaz 2 ve E2F1 içeren hücre döngüsünü düzenleyici proteinlerin ekspresyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca, Anneksin-V/PI ikili boyama kullanılarak akım sitometri aracılığı ile ekstraktın apoptotik hücre ölümünü teşvik ettiği belirlenmiştir. Aynı zamanda, Western blot analizleri, apoptotik hücre ölümlerinin mitokondri bağımsız ve kaspaz bağımlı yollar aracılığı ile gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır.

Koparal ve ark. (2010), *Pseudevernia furfuracea* liken türünden elde edilen olivetorik asidin anti-anjiyogenik aktivitesini incelemişlerdir. Sıçanlardaki adipoz doku endotelyum hücrelerinin, çoğalmasının *in vitro* şartlarda inhibe edildiği ve damar gelişiminin engellendiği saptanmıştır. Ayrıca olivetorik asidin doza bağlı olarak F-aktin stres fiberler üzerinde depolimerizasyon etkisinin olduğu görülmüştür.

O'Neill ve ark. (2010), gerçekleştirdikleri çalışmada usnik asit sekonder metabolitinin mitoz endekslerini belirlemek suretiyle mikrotübüllerin oluşumunu ve/veya stabilizasyonu etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. 24 saat sonunda vinkristin veya taksol pozitif kontrol grupları ile beraber 29 µM usnik asidin MCF7 meme kanser hücre hattı ve H1299 akciğer kanser hücre hattı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Usnik asit uygulanan MCF7 ve H1299 hücrelerinin mikrotübüllerde herhangi bir morfolojik değişime uğramadığı veya mitotik endekste bir artış olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar usnik asit antineoplastik aktivitesinin, mikrotübüllerin stabilizasyonu ve/veya formasyonundaki değişimiyle ilişkili olmadığını göstermiştir.

Atalay ve ark. (2011), *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. ve *Usnea longissima* Ach.'dan izole ettikleri stiktik asit, isidiophorin, rizo aldehit, rizonil alkol, pulmonarianin, vesuvianik asit, ergosterol peroksit, usnik asit ve difraktaik asidin lipit peroksidasyon inhibisyonu ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal yakalama aktivitelerini incelemişlerdir. Bunların arasından isidiophorin, rizo aldehit, rizonil alkol ve pulmonarianin daha yüksek seviyede aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

Bačkorová ve ark. (2011), potansiyel olarak yeni anti-kanser ilaçlar için yapılan denemelerde, likenlerin *in vitro* kanser modellerine karşı etkili olabilen eşsiz kimyasal ajanlar olduklarını öne sürmüşler ve yaptıkları çalışmada dört çeşit liken sekonder metabolitinin (parietin, atranorin, usnik asit ve giroporik asit) dokuz insan kanser hücre hattı (A2780, HeLa, MCF-7, SK-BR-3, HT-29, HCT-116 p53^{+/+}, HCT-116 p53^{-/-}, HL-60 ve Jurkat) üzerindeki anti-sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Tümörlü hücre hattı popülasyonlarının dinamiklerindeki değişkenler MTT, klonojenik ve yaşayabilirlik uygulamaları, hücre büyümesi ve bölünmesi, hücre döngü geçişi ve apoptotik çekirdek morfolojisi aracılığıyla değerlendirilmiştir. Parietin ve giroporik aside kıyasla usnik asit ve atranorin ile sağlanan hücre büyümesini engelleme ve yaşayabilirlik özelliğinin bastırılmasının daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Jeong ve ark. (2011), *Fructus ligustri lucidi* (FLL) ekstraktlarının U87MG glioma hücreleri üzerindeki antikanserojen etkilerini incelemişlerdir. FLL ekstraktlarının doza ve zamana bağlı olarak hücre ölümüne sebep oldukları saptanmıştır. Western blot analizleri FLL ekstraktlı uygulamaların fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K)/Akt yolunun aşağı-regülasyonuna sebep olduğunu göstermiştir. Akt'nin aşırı ekspresyonu FLL ekstraktları tarafından indüklenen hücre ölümünü teşvik etmiştir. FLL ekstraktları, rapamisinin memeli hedef ekspresyonunda (mTOR) azalmaya sebep olmuştur ve FLL ekstrakt indüklü hücre ölümü mTOR inhibitör rapamisin tarafından artırılmıştır. FLL ekstraktları survivin ekspresyonunu düşürmüştür. Elde edilen bulgular, FLL ekstraktlarının Akt/mTOR/survivin yolunun regülasyonu aracılığı ile glioma hücre ölümüne sebep olduğunu göstermiştir.

Melo ve ark. (2011), atranorin ile zenginleştirilmiş liken ekstraktlarının geleneksel tıp alanında yaygın olarak kullanıldıklarını belirtmişler ve yaptıkları çalışmada atranorinin biyolojik aktiviteleri üzerinde durmuşlardır. Hidroksil radikal, hidrojen peroksit, süperoksit radikal ve nitrik oksite karşı çeşitli *in vitro* koşullarda atranorinin serbest radikal aktiviteleri ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca toplam reaktif antioksidan potansiyeli ve toplam antioksidan reaktivite indeksleri ve *in vitro* lipoperoksidasyon değerleri ölçülmüştür. Bu çalışmalara ek olarak atranorinin, MTT uygulamaları ile H₂O₂ SH-SY5Y hücreleri üzerindeki hücre koruma etkileri

belirlenmiştir. Atranorinin sitotoksik olmadığı ve aynı zamanda SH-SY5Y hücrelerini H₂O₂-tesirli hücre yaşayabilirlik bozunmaya karşı koruduğu tespit edilmiştir.

Mitrović ve ark. (2011), *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* ve *Cladonia foliacea* liken türlerinden elde edilen metanol ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan ve antiproliferatif potansiyellerini araştırmışlardır. Test edilen ekstraktlar içerisinde *H. physodes* ekstraktı en yüksek fenolik içerik ile en güçlü DPPH radikal aktivitesi göstermiştir. *H. physodes* ve *C. foliacea* ekstraktları Gram (+) bakteriler üzerinde en yüksek derecede antimikrobiyal etki göstermiştir. Kolon kanseri adenokarsinom hücre hattı olan HCT-116 üzerinde MTT uygulaması aracılığıyla yaşayabilirlik testi gerçekleştirilmiştir. *H. physodes* ve *C. foliacea* likenlerinden elde edilen metanol ekstraktlarının diğer ekstraktlara kıyasla daha iyi sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca test edilen tüm liken türlerinin HCT-116 hücrelerinin apoptozunu teşvik ettiği de rapor edilmiştir.

Ranković ve ark. (2011), *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* ve *Lecanora muralis* likenlerinin aseton ekstraktlarının *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivitelerini incelemişlerdir. FemX (insan melanom hücre hattı) ve LS174 (insan kolon kanseri hücre hattı) üzerinde MTT testi yapılarak antikanser aktiviteleri test edilen aseton ekstraktlarının tümünün 8,51-40,22 µg/mL arasında gösterdikleri IC₅₀ değerleri ile yüksek antikanser aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir.

Thadhani ve ark. (2011), liken metabolitlerinden sekikaik, lekanorik ve lobarik asidin speroksit, nitrik oksit ve DPPH radikallerini yakalama aktivitelerini araştırmak suretiyle bu metabolitlerin antioksidan kapasitelerini incelemişlerdir. Süperoksit radikal yakalama aktivitesi deneyinde sekikaik ve lekanorik asit sırasıyla 82 ve 91,5 µmol IC₅₀ değerleri ile önemli derecede antioksidan aktivite göstermişlerdir. Lobarik asit ise aynı deneyde 97,9 µmol IC₅₀ değerine sahip olmuştur.

Manojlović ve ark. (2012a), yaptıkları çalışmada *Parmelia caperata*, *P. saxatilis* ve *P. sulcata* likenlerinin aseton ekstraktlarındaki kimyasal içeriklerden bazılarını izole ederek bu bileşenlerin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivitelerini incelemişlerdir. *P. caperata* ekstraktında üstün basan fenolik içeriklerin protosetarik

asit ve usnik asit, diğerk iki liken türü ekstraktında ise salazinik asit olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiklerin haricinde bu ekstraktlarda atranorin ve kloroatranorin bileşiklerine de rastlanmıştır. Çalışma sonunda ortaya çıkan verilere göre, salazinik asidin protosetrarik aside kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği, antimikrobiyal çalışmasında ise her iki bileşenin de yüksek oranda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. FemX (insan melanom hücre hattı) ve LS174 (insan kolon kanseri hücre hattı) üzerinde gerçekleştirilen antikanser denemesinde ise yine salazinik ve protosetrarik asidin 35,67-60,18 µg/mL arasında değışen IC50 değerleri ile güçlü antikanser aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir.

Paudel ve ark. (2012), doğadan topladıkları altı familyaya ait liken türünden elde ettikleri ekstraktların antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkilerini incelemişlerdir. 21 liken türünün *B. subtilis*' e karşı, 7 liken türünün ise *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenirken, antioksidan denemeleri için gerçekleştirilen DPPH yakalama uygulamalarında, *Peltigera* sp., *Cladonia* sp. ve *Canoparmelia* sp. türlerinin standart bileşik olan BHA ile yakın aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca ABTS⁺ denemelerinde *Parmotermia* sp., *Ramalina* sp., *Peltigera* sp. ve *Cladonia* sp. türlerinin askorbik asitten daha fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Aynı şekilde *Heterodermia* sp. ve *Ramalina* sp. türlerinden elde edilen metanol ekstraktlarının ise antikanser ilaçlarının potansiyel bir kaynağını işaret eden standart berberin klorür maddesi ile yakın seviyede toksisite gösterdiği rapor edilmiştir.

Ranković ve ark. (2012), *Toninia candida* ve *Usnea barbata* likenlerinin aseton ekstraktlarının ve bazı metabolitlerinin *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivitelerini test etmişlerdir. *T. candida*'da norstiktik asit, *U. barbata*'da ise usnik asit izole edilmiştir. Usnik asidin yüksek oranda antimikrobiyal ve FemX (insan melanom hücre hattı) ve LS174 (insan kolon kanseri hücre hattı) üzerinde antikanserojen etki gösterdiği belirlenirken, güçlü antioksidan aktivitenin norstiktik aside ait olduğu tespit edilmiştir.

Turkez ve ark. (2012), gerçekleştirdikleri çalışmada, *Xanthoria elegans* liken türünün su ekstraktlarının (XEE) (25, 50 ve 100 µg/mL) insan lenfosit kültürlerinde genotoksik ve oksidatif stresi tetikleyen mitomisin C (MMC; 10⁻⁷ M) üzerindeki etkilerini test

etmişlerdir. Deneme kapsamında insan kan kültürleri üzerinde kromozomal aberasyona, mikroçekirdek oluşumuna, kardeş kromatid değişimine ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG) metabolizmasına bakılmıştır. Ayrıca *X. elegans* türünün, toplam antioksidan kapasitesi (TAC) ve toplam oksidatif stres (TOS) oluşturma derecesi, yani biyokimyasal parametreleri de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, insan periferik lenfosit hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla MMC tarafından oluşturulan sitogenetik bitiş noktalarının frekansı ve 8-OH-dG seviyelerinde önemli derecede artış olduğu gözlemlenmiştir. MMC, TAC ve TOS seviyelerini değiştirerek oksidatif strese sebep olmuştur. Diğer taraftan XEE, TOS seviyesini değiştirmeden TAC seviyesinin artmasına sebep olmuştur. XEE'nin genotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Dahası, MMC tarafından tetiklenen dört genotoksik indeksin ortalama frekanslarındaki artış XEE'nin dozlarına bağlı olarak XEE tarafından azaltılmıştır. XEE'nin MMC hücrelerine karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu deneme ilk kez yararlanılan XEE'nin doğal antigenotoksik maddelerin potansiyel kaynağı olabileceğini göstermiştir.

Brandao ve ark. (2013), *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, *Usnea subcavata* Motyka, *Usnea* sp., *Ramalina* sp., *Cladina confusa* (Sant.) Folmm. Ahti, *Dirinaria aspera* Häsänen ve *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler likenlerinden izole ettikleri atranorin, lichexanthone, (+)-usnik, diffraktaik, divarikatik, perlatolik, psoromik, protosetrarik ve norstiktik asidin UACC-62 ve B16-F10 melanom hücrelerine ve 3T3 normal hücrelere karşı etkilerini incelemişlerdir. Sülforhodamin B uygulaması ile protosetrarik, divarikatik ve perlatolik asidin UACC-62 hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etki gösterdikleri saptanmıştır (IC₅₀ değerleri sırasıyla: 0,52, 2,7 ve 3,3 µg/mL). B16-F10 ve 3T3 hücreleri üzerinde en yüksek aktivite gösteren olan asitler divarikatik ve perlatolik asit olmuştur.

Brisdelli ve ark. (2013), altı liken metabolitinin (diffraktaik asit, lobarik asit, usnik asit, vicanicin, variolarik asit ve protolikesterinik asit), MCF-7 (meme kanser hücre hattı), HeLa (rahim kanser hücre hattı) ve HCT-116 (kolon kanser hücre hattı)'ya karşı proliferasyon, görünürlük ve reaktif oksijen tür (ROS) seviyesi etkilerini incelemişlerdir. Hücreler bu bileşenlerin farklı konsantrasyonlarına (2.5-100 µM) maruz bırakılmıştır. Konsantrasyona bağlı olarak farklı sitotoksik etkiler ortaya çıkmıştır.

Variolarik asit kullanılan üç hücre hattı üzerinde de proliferasyonu inhibe edici etki göstermezken, usnik asit en kuvvetli sitotoksik madde olmuştur. Metabolitler ROS seviyesini önemli derecede artırmamış ve HeLa hücrelerinde t-bütilhidroperoksit tarafından indüklenen oksidatif hasarın önüne geçmemiştir. HeLa hücrelerindeki 40 µM protolikesterinik asidin antiproliferatif aktivitesinin, kaspaz-3,8 ve 9 aktivasyonunu içeren apoptozun uyarılması ile ilgili olduğu ortaya çıkmıştır.

Cheng ve ark. (2013), hücre ölümünü tetikleyen topoizomeraz enzimler tarafından oluşturulan ara DNA parçalanma kompleksinin birikmesinde öncülük eden topoizomeraz inhibitörlerinin antibakteriyal ve antikanser terapi için etkili olduklarını savunmuşlardır. Çalışmada, *Yersinia pestis* ve *Escherichia coli* topoizomeraz I'in her ikisi için de inhibitör olarak *Hypotrachyna* sp. likeninden elde edilen anziaic asit kullanılmıştır. *In vitro* şartlarda anziaic asidin *Bacillus subtilis*'e ve *E. coli*'nin bir zar geçirgen suşuna karşı antibakteriyal etki göstermiştir. Ayrıca anziaic asidin, insan topoizomeraz I üzerinde etkisinin az olduğu görülmesine rağmen, topoizomeraz II'nin inhibitörü olarak görev yaptığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, bir liken depsidi olan anziaic asidin topoizomeraz zehir inhibitörü olarak görev gören doğal bir antibakteriyal ve antikanser bileşen olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Ghate ve ark. (2013), *Parmotrema reticulatum* likeninin metanol ekstraktının (PRME), fitokimyasal analizlerini gerçekleştirerek, antioksidan ve MCF-7 (meme kanseri hücre hattı), A549 (akciğer kanseri hücre hattı) ve WI-38 (sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı) üzerinde antikanser aktivitelerini incelemişlerdir. PRME'nin çok yüksek oranda hidroksil ve hipoklorus radikal temizleyici etki göstermesinin yanında, DPPH, süperoksit, tekli oksijen, nitrik oksit ve peroksinitrit süpürücü aktiviteye sahip olduğu da tespit edilmiştir. PRME'nin MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etki yaptığı görülürken, A549 ve WI-38 hücreleri üzerinde kayda değer bir sitotoksik etkiye rastlanmamıştır. Daha sonra yapılan akım sitometri çalışması, PRME'nin MCF-7 hücrelerini S ve G2/M fazlarında durdurduğunu ve geçen süreye bağlı olarak belirli dozda apoptoza neden olduğunu göstermiştir.

Kosanić ve ark. (2013), *Evernia prunastri* ve *Pseudoevernia furfuraceae* likenlerinin aseton ekstraktlarının ve bazı kimyasal bileşenlerinin *in vitro* antioksidan,

antimikrobiyal ve antikanser aktivitelerini test etmişlerdir. Sekonder metabolitler HPLC-UV metodu ile teşhis edilmiştir. Antikanser aktivitesi için FemX (insan melanom hücre hattı) ve LS174 (insan kolon kanseri hücre hattı) kullanılmıştır. Denemesi gerçekleştirilen tüm alanlarda fisodik asidin yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Leandro ve ark. (2013), (+)-usnik asidin, mikronükleus ve comet uygulamaları ile V79 hücre kültürleri ve İsviçre fareleri üzerindeki genotoksik ve antigenotoksik potansiyellerini belirlemeye çalışmışlardır. Genotoksisite araştırması için klonogenik sitotoksik uygulaması baz alınarak, V79 hücrelerine 15, 30, 60 ve 120 µg/mL konsantrasyonlarında, farelere ise 25, 50, 100 ve 200 mg/kg vücut ağırlığı usnik asit uygulanmıştır. Antigenotoksisite uygulaması için usnik asidin aynı konsantrasyonları metil metansülfonat ile kombine edilmiştir. *In vitro* denemede Comet uygulaması sayesinde usnik asidin, 60 ve 120 µg/mL konsantrasyonlarında DNA zararını uyardığı, fakat V79 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen mikronükleus testinde genotoksik etki gözlenmemiştir. *In vivo* test sisteminde de farklı usnik asit denemelerinde genotoksik etkiye rastlanmamıştır. Usnik asit ve metil metansülfonat kombineli uygulamanın mikronükleus frekansını ve DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir.

Markiewicz-Żukowska ve ark. (2013a), bir arı balı ürünü olan propolisin etanol ekstraktının (EEP) temozolomit (TMZ) ile birlikte U87MG hücre hattı büyümesini inhibe edip etmediğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, EEP'nin TMZ ile birlikte sitotoksik özellikte olduğu ve U87MG hücrelerine karşı büyümeyi inhibe edici aktiviteyi yükselttiği ortaya çıkmıştır. Bu sonuca, NF-κB'nin indirgenmiş bir aktivitesinin aracılık ettiği saptanmıştır.

Markiewicz-Żukowska ve ark. (2013b), üç farklı arı yeminden elde ettikleri etanol ekstraktlarının (EBB) farklı konsantrasyonlarının (10, 20, 30, 50, 100 µg/mL), 24, 48 ve 72 saat sonrasında U87MG hücrelerinin canlılığına nasıl etki ettiklerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, EBB ile muamele edilen U87MG hücrelerinin canlılığı üzerinde zamana bağlı olarak inhibisyonun arttığını ortaya çıkarmıştır. EBB'nin temel inhibisyon etkisi 72 saat sonrasında gözlenmiştir. EBB uygulaması, hücre canlılığını %49-66 oranına düşürmüştür.

Munzi ve ark. (2013), fare miyelom hücrelerine (P3X63-Ag8.653) karşı *Peltigera* cinsine ait üç liken (*P. canina*, *P. elisabethae* ve *P. praetextata*) türünün su, etanol ve metanol ekstraktlarının antiproliferatif aktivitelerini incelemiştir. Su ekstraktlarının hücre proliferasyonunu düşürmede daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Pejin ve ark. (2013), *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. (Lobariaceae) likeninden izole ettikleri stiktik asidin, HT-29, MCF-7 kanser hücre hatları ve MRC-5 normal hücre hattı üzerindeki inhibisyon etkisini incelemiştir. Stiktik asidin, HT-29 hücre hattı üzerinde IC₅₀ değerinin 29,29 µg/mL olduğu ve orta seviyede bir sitotoksik etki gösterdiği belirlenirken, kanserli olmayan normal MRC-5 hücre hattı üzerinde ise 2478,40 µg/mL'lik IC₅₀ değeri ile büyümeyi inhibe edici etkisinin düşük olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar ile doğal bir ürün olan stiktik asidin insan kolon kanseri tedavisinde umut verici sonuçlar doğurabileceği fikri ortaya çıkmıştır.

Singh ve ark. (2013), liken sekonder metaboliti olan usnik asidin (25–100 µM) farklı konsantrasyonlarının A549 (insan akciğer kanser hücre hattı) üzerindeki etkilerine bakmışlardır. 24 ve 48 saat sonrasında hücrelerin sayısında kayda değer bir azalma gözlenmiştir. Çalışma sonucunda usnik asidin, hücre döngüsünün G0/G1 aşamasını tutukladığı, mitokondrial membran depolarizasyon aracılığı ile hücre ölümünü indüklediği ve insan akciğer hücre hatlarında apoptozu meydana getirdiği tespit edilmiştir.

Wang ve ark. (2013), *Punica granatum*'dan izole edilen bir polifenol olan punikalajinin insan U87MG glioma hücreleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Punikalajinin doza bağlı olarak, artan siklin E seviyesi ve azalan siklin B ve A seviyeleri ile birlikte hücre canlılığını inhibe ettiği saptanmıştır. Uygulama, hücrelerdeki kaspaz-3 aktivitesinin artışı, kaspaz-9'un aktivasyonu ve polimerazın ayrılması ile apoptozu indüklemiştir. Ayrıca punikalajin, otofajik hücre ölümünü indüklenmesi ile ilişkili olan, hücrelerdeki Th1198'deki fosfor-AMPK ve fosfor-p27 seviyelerinin artmasına neden olmuştur.

Ari ve ark. (2014a), *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. likeninin metanol ekstraktının kimyasal bileşiklerini, gonotoksik ve antiproliferatif etkilerini araştırmışlardır. Antiproliferatif etki iki farklı insan meme kanser hücre hattı (MCF-7 ve MDA-MB-231)

üzerinde MTT ve ATP canlılık deneyleri aracılığı ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda, daha yüksek konsantrasyonlarda genotoksik aktivitenin, daha düşük konsantrasyonlarda ise antiproliferatif etkinin yüksek olduğu görülmüştür.

Ari ve ark. (2014b), *Parmelia sulcata* Taylor likeninden gaz kromatografisi aracılığı ile izole ettikleri bazı bileşenlerin meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerinde antiproliferatif etkilerini MTT ve ATP canlılık deneylerini gerçekleştirerek test etmişlerdir. Hücre ölüm biçimlerini (apoptoz/nekroz) belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda *P. sulcata*'nın düşük dozlarda kaspaza bağlı olmayan apoptotik hücre ölümünü indüklediği ortaya çıkmıştır.

Çelikler Kasımoğulları ve ark. (2014), likenlerin potansiyel antikanser aktivitelerine sahip olduklarına dikkat çekerek, yaptıkları çalışmada *Usnea filipendula* Stirt. likeninin metanol ekstraktının meme kanseri hücre hatlarına (MCF-7 ve MDA-MB-231) karşı genotoksik ve antiproliferatif özelliklerini araştırmışlardır. Antiproliferatif özellik, MTT ve ATP canlılık deneyleri ile test edilirken, hücre ölüm biçimi (apoptoz/nekroz), morfolojik (floresan boyama) ve biyokimyasal (kaspaz bağlı sitokeratin 18, kaspaz-3 aktivitesi ve poli-(ADP-riboz) polimeraz (PARP) hücre bölünmesi) açıdan incelenmiştir. *U. filipendula*'nın genotoksik aktivitesi, insan lenfosit kültüründe gerçekleştirilen mikronükleus, kromozomal aberasyon ve comet testleri aracılığı ile belirlenmiştir. Araştırmalar sonucunda, *U. filipendula*'nın doza bağlı bir şekilde hücre gelişimini inhibe ettiği ve PARP bölünmesi ve aktif kaspaz-3 endüksiyonu tarafından apoptozu indüklediği görülmüştür. Ayrıca, bu liken türü 125 ve 250 µg/mL dozlarında apoptoz için gerekenden daha yüksek oranda genotoksik aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, *U. filipendula*'nın düşük dozlarda apoptotik hücre ölümünü teşvik ettiği, yüksek dozlarda ise genotoksik etki gösterdiği saptanmıştır.

Grujičić ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada *Cetraria islandica* likeninin metanol ekstraktının antioksidan, antimikrobiyal, genotoksik ve antikanserojen aktivitelerini test etmişlerdir. Bu testler, serbest radikal ve süperoksit anyon süpürücü, indirgeme gücü, toplam fenol ve flavonoid içerikleri, beş bakteri ve beş fungus türüne karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu aktiviteleri, periferik kan lenfositleri üzerinde (PBLs) sitokinez blok mikronükleus (MN) uygulamaları ve FemX (insan melanom hücre hattı)

ve LS174 (insan kolon kanseri hücre hattı) üzerine MTT uygulaması yapılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, test edilen ekstraktın 22,68 ve 33,74 µg/mL'lik IC₅₀ değerleri ile antikanser denemesinde, her iki hücre hattı üzerinde de yüksek oranda antikanser aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bu ekstraktın belli oranda *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal ve genotoksik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Karagoz ve ark. (2014), *Usnea longissima* liken türünden izole ettikleri sekonder metabolitlerden diffraktaik asidin *in vivo* Ehrlich asit tümörü üzerindeki antikanserojen etkisini incelemişlerdir. Serum örneklerinden hematolojik parametreler ölçülmüştür. Mide, karaciğer, böbrek, ince ve kalın bağırsak dokuları histopatolojik olarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda diffraktaik asidin Ehrlich karın iltihabı kanserli hücreleri üzerinde antitümör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, hematolojik ve histopatolojik çalışmalar diffraktaik asidin düşük dozlarının yüksek dozlarına kıyasla koruyucu etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Khan ve ark. (2014), MTT uygulamasını kullanarak, *Abutilon indicum* yapraklarının petrol eteri, metanol ekstraktlarının (AIM) ve AIM'den hazırlanan kloroform (AIM-C) ve etil asetat (AIM-E) alt-fraksiyonlarının U87MG insan glioblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Bu ekstraktların 42,6-64,5 µg/mL arasındaki IC₅₀ değerleri ile önemli ölçüde aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. En aktif AIM-C fraksiyonundan metil trans-p-kumarat, metil caffeate, siringik asit ve pinellik asit elde edilmiştir. Bu dört bileşikten en aktif olanının metil caffeate olduğu tespit edilmiştir (IC₅₀ = 8,2 µg/mL). Ayrıca bu bileşiklerin normal insan hücreleri (HEK-293) üzerinde toksik etki göstermediği rapor edilmiştir.

Kosanić ve ark. (2014), *Cladonia furcata*, *Cladonia pyxidata* ve *Cladonia rangiferina* likenlerinden elde edilen aseton ekstraktlarının ve yine bu likenlerden izole edilen atranorin ve fumarprotosetrarik asidin *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivitelerini test etmişlerdir. En yüksek antioksidan aktivite 131,48 mg/mL'lik IC₅₀ değerine sahip olan atranorinde, en fazla antimikrobiyal aktivite fumarprotosetrarik asitte görülmüştür. FemX (insan melanom hücre hattı) ve LS174 (insan kolon kanseri hücre hattı) üzerinde MTT testi yapılarak antikanser aktiviteleri test edilen tüm örneklerin güçlü antikanser aktivite gösterdikleri saptanmıştır.

Kumar ve ark. (2014), 14 liken türünün n-hekzan, metanol ve su ekstraktlarının antioksidan kapasitelerini ve HepG2 ve RKO kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. *Lobothallia alphoplaca* ve *Xanthoparmelia stenophylla*'nın metanol ekstraktları ve *Rhizoplaca chrysoleuca*'nın n-hekzan ekstaktı, *Xanthoria elegans*'ın ise su ekstaktı yüksek seviyede antioksidan aktivite göstermiştir. *Melanelia disjuncta* ve *L. alphoplaca*'nın metanol ekstraktları kanserli hücre gelişimine karşı yüksek sitotoksik etki göstermiştir.

Nguyen ve ark. (2014), bazı kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerini inceledikleri 17 liken türü içerisinde *Flavocetraria cucullata*'nın en etkili liken olduğunu tespit etmişlerdir. Bu liken türünün aseton ekstaktından elde edilen usnik asit, salazinik asit, skuamatik asit, baeomycesic asit ve d-protolichesterinic asit bileşikleri ve ekstaktın kendisi MTT analizi aracılığı ile hücelere uygulanmıştır. Bileşiklerden usnik asidin ve aseton ekstaktının kanser hücre hatları üzerinde apoptotik ölüme sebep olduğu belirlenmiştir. Kanser hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) markır seviyesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Tüm denemeler göz önüne alındığında aseton ekstaktının antikanser aktivitesinin usnik aside kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Rahman ve ark. (2014), *Dioscorea nipponica* bitkisinin astım, romatoid artrit, bronşit ve birçok diğer hastalıkta Kore'de gelenkesel ilaç amaçlı kullanıldığını belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada, hücresel sitotoksisite, hücre canlılığı deneyi sayesinde, DNA fragmentasyonu ise DNA merdiveni uygulaması ile test edilmiştir. Farklı protein ekspresyonu aktivasyonu western blot analizleri ile tespit edilmiştir. *D. nipponica* ekstaktının 24 saat sonunda, SH-SY5Y hücre canlılığını 27,57 µg/mL IC₅₀ değeri ile düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca, antiapoptotik proteinlerin DNA ekspresyonunun B-hücre lenfoması-2 (Bcl-2), ekstra büyük B-hücresi lenfoması (Bcl-xL) ve miyeloid hücre lösemisi 1 (Mcl-1)'i içerdiği belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar, *D. nipponica* ekstaktının SH-SY5Y hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin, iç mitokondriyal kaspaz aracılığı ile gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Schinkovitz ve ark. (2014), *Lobaria scrobiculata* likeninden izole ettikleri yedi metabolitin HL-60 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. MTT ve

tripan mavi uygulamaları sonucunda ortaya çıkan veriler bu metabolitlerin HL-60 hücre hattı üzerinde antikanser aktivite gösterdiğini kanıtlamıştır.

Shrestha ve ark. (2014), 17 liken türünden elde ettikleri ham ekstraktların Burkitt lenfoma (Raji) hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. Bu likenler içerisinde *Xanthoparmelia chlorochroa* ve *Tuckermannopsis ciliaris* türlerinin düşük IC₅₀ değerleri ile hücre ölümüne sebep oldukları belirlenmiştir. Bu likenlerden elde edilen ekstraktlar proliferasyonu azaltmış ve hücreleri G0/G1 fazında tutmuşlardır.

Stojanović ve ark. (2014), *Hypogymnia physodes*'in metanol ekstraktının ve metanol ekstraktından elde ettikleri fisodalik asit, fisodik asit ve 3-hidroksi fisodik asit bileşiklerinin HeLa kanser hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini incelemişlerdir. Bu üç bileşiğin ve metanol ekstraktının 10-1000 µg/mL konsantrasyonlarının 24 ve 72 saat inkübasyona bırakılan HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine bakıldığında, fisodik asit ve 3-hidroksi fisodik asidin fisodalik aside kıyasla daha yüksek oranda aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Fisodalik asit, fisodik asit ve 3-hidroksi fisodik asit ve metanol ekstraktının 24 saat IC₅₀ değerleri sırasıyla 964, 171, 97 ve 254 µg/mL iken 72 saat IC₅₀ değerleri sırasıyla 283, 66, 63 ve 68 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar

Madde Adı	Firma
Aseton çözücüsü	Merck
B-27	Gibco
Diffraktaik asit bileşiği	Gaia Chemical
Dimetil sülfoksit (DMSO) çözücüsü	Merck
DNA/RNA oksidatif hasar EIA kiti	Cayman
DNAaz tip 1	Sigma
Dötoro kloroform çözücüsü (CDCl ₃)	Merck
Etanol çözücüsü	Merck
Etil asetat çözücüsü	Merck
Fetal bovine serum (FBS)	Sigma
İTK Silika Jel 60 F ₂₅₄	Merck
Laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksisite uygulama kiti	Cayman
L-glutamat	Sigma
Lobarik asit bileşiği	Gaia Chemical
Metanol çözücüsü	Merck
MTT hücre proliferasyon kiti	Cayman
n-Hekzan çözücüsü	Merck
Nörobazal medyum (NBM)	Gibco
Penisilin-Streptomisin	PAN Biotech
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medyumu	Sigma
Silika jel / 70-230 mesh	Merck
Toplam antioksidan kapasite (TAK) uygulama kiti	Rel Assay Diagnostics
Toplam oksidan durum (TOD) uygulama kiti	Rel Assay Diagnostics
Tripan mavisi	Sigma
Tripsin-EDTA / 10X	Sigma
Usnik asit bileşiği	Gaia Chemical

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri ve Cihazlar

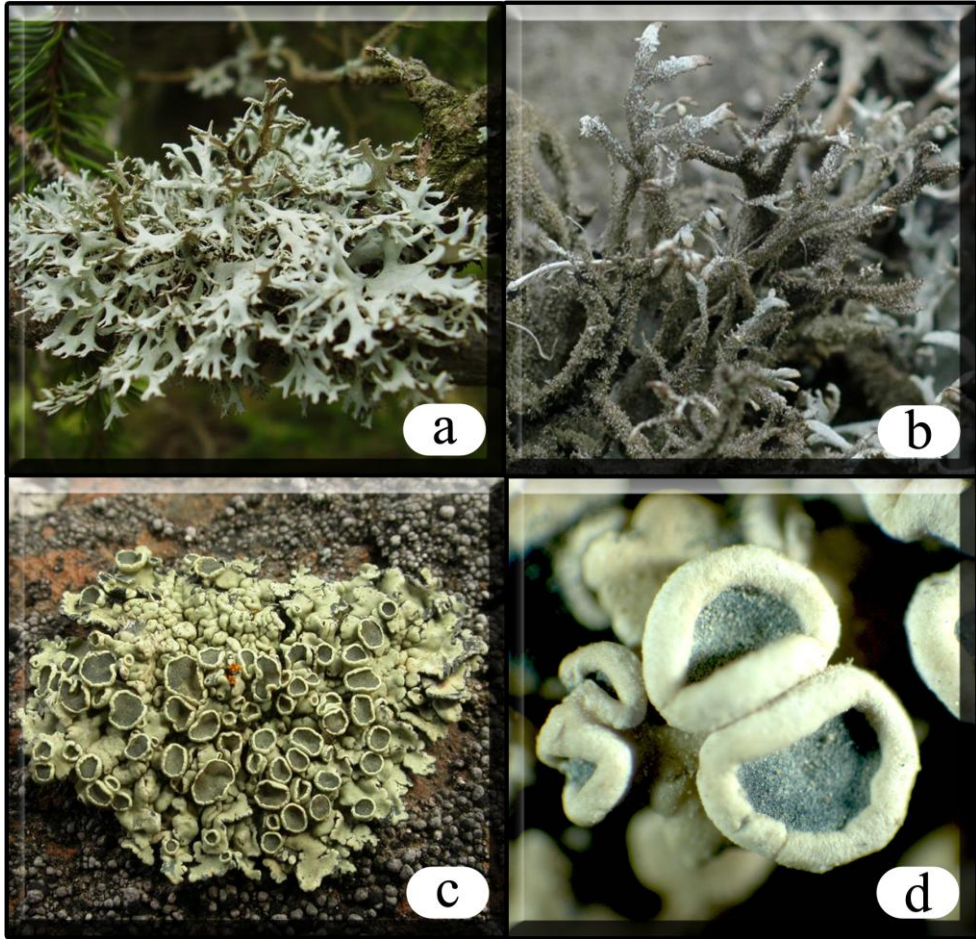
Deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler ve cihazlar çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler ve cihazlar

Gereç / Cihaz Adı	Marka
Bitki öğütme değirmeni	Protech
Buzdolabı	Arçelik ve Bosch
Cam malzemeler / Balon joje, beher, büret, erlen, hüni, kolon, mezür vb.	Isolab
Çekerocak	Feta
Derin dondurucu	Sanyo
Distile su cihazı	Barnstead Easypure
Döner buharlaştırıcı	IKA RV 10
Elektronik hassas terazi	Precisa ve Ohaus
Etüv	Nüve
Hücre kültür flaskı / 25 cm ² , 75 cm ²	Sigma
Hücre kültür tüpü / 12 mL	Grenier Bio-One
İnverted mikroskop	Euromex
Karbondioksitli inkübatör / Su yelekli	Napco
Laboratuvar standı / 3 ayaklı	Labor-teknik
Laminar hava akışlı kabin	Nüve
Manyetik karıştırıcı	Boeco
Mikropipet / 0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL	Eppendorf
Mikroplaka / 96 kuyucuklu	Costar
Mikroplaka okuyucu	Bio-Tek
NMR spektrometre	Varian
Orbital çalkalayıcı	Labnet
pH metre	Mettler
Santrifüj cihazı	Nüve
Soxhlet ekstraktörü	Termal
Steril enjektör / 5 cc	Hayat tıbbi aletler
Su banyosu	Nüve
Şırınga ucu filtreleri	Merck
Ultraviyole (UV) lambası / 254-366 nm	Mineralight
Vorteks	IKA

3.1.3. Likenler

Pseudevernia furfuracea (L.) Zopf ve *Rhizoplaca melanophthalma* (DC.) Leuckert (Şekil 3.1) türleri Erzurum ve Trabzon illeri ve ilçelerinden tespit edilen istasyonlardan toplanarak oda şartlarında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra herbaryumları yapılarak çeşitli flora kitaplarından faydalanmak suretiyle teşhisleri Prof. Dr. Ali ASLAN tarafından yapılmıştır. Herbaryum örnekleri Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi herbaryumunda muhafaza edilmektedir (Purvis ve ark., 1992; Wirth, 1995).



Şekil 3.1 Sekonder metabolit eldesinde yararlanılan liken türleri a-b) *Pseudevernia furfuracea*; c-d) *Rhizoplaca melanophthalma*

3.1.4. Deney Hayvanları ve Hücre Kültürleri

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen yeni doğan Sprague-Dawley cinsi deney hayvanları kullanılmıştır. Hayvanların etik kurallara uygun olarak dekapite edildiği, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 13.02.2015 tarihli ve 42190979-01-02/705 sayılı yazı ile onaylanmıştır. Hayvanlardan elde edilen nöronlar hücre kültürü ortamında yaşatılmıştır. Ayrıca U87MG glioblastoma hücre hattı Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden temin edilmiştir.

3.1.5. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.1.5.1. PSSK Hücre Kültürü Medyumu

%10 FBS

%2 B-27

%0,1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin)

Toplam hacimde geri kalan miktar NBM ile tamamlanmıştır.

3.1.5.2. U87MG Glioblastoma Hücre Kültürü Medyumu

%10 FBS

%1 L-glutamat

%1 Antibiyotik (Penisilin-Streptomisin)

Toplam hacimde geri kalan miktar RPMI 1640 medyumu ile tamamlanmıştır.

3.1.5.3. Fosfat Tamponlu Salin (PBS)

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

1 L distile su

Çözeltinin pH'ı 7,4 olacak şekilde ayarlanmış ve çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.1.5.4. Hank Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS)

0,185 g CaCl

0,097 g MgSO₄

0,4 g KCl

0,06 g KP (Monobazik)

8 g NaCl

1 L distile su

3.1.5.5. Sekonder Metabolit Çözeltileri

Denemelerde kullanılan altı adet liken sekonder metabolitinden fisodik asit, psoromik asit ve olivetorik asit arazi çalışmaları sonucunda toplanan likenlerden izole edilirken, difraktaik asit, lobarik asit ve usnik asit ise ticari olarak satın alınmıştır.

Metabolitler, çözeltinin %2'si DMSO çözücüsü olacak şekilde, DMSO + uygulanacak ilgili hücre kültürü medyumu içerisinde çözdürülmüştür. Bu şekilde her bir metabolit için ayrı bir stok çözelti oluşturulmuştur. Elde edilen stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak hücreler ile beraber medyumun bulunduğu plaka kuyucuklarının her birinde nihai sekonder metabolit konsantrasyonun 2,5, 5, 10, 20 ve 40 mg/L olması sağlanmıştır. Negatif kontrol (Kontrol(-)) grubu olarak %2'si DMSO çözücüsü olacak şekilde, DMSO + uygulanacak ilgili hücre kültürü medyumu kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Ekstraksiyon

Toplanan likenler toz haline getirildikten sonra Soxhlet ekstraktöründe (Şekil 3.2) ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Her bir likenden 150 g kullanılmıştır. *Pseudevernia furfuracea* türü etanol çözücüsünde 80°C’de ve *Rhizoplaca melanophthalma* türü aseton çözücüsünde 60°C’de 5 gün ekstrakte edilmiştir.



Şekil 3.2 Ekstraksiyon işleminin yapıldığı Soxhlet ekstraktörü ve kurulan düzenek

Ekstraktlar adi süzgeç kâğıdında süzölmüş ve elde edilen süzöntöler döner buharlaştırmacı (Şekil 3.3) ile yoğunlaştırılmıştır. *Pseudevernia furfuracea* ekstraksiyonu sonucunda 30,4 g ve *Rhizoplaca melanophthalma* ekstraksiyonu sonucunda 26,2 g ham ekstraktlar elde edilmiştir.



Şekil 3.3 Ekstraktların yoğunlaştırıldığı döner buharlaştırıcı

3.2.2. Ekstraktlar Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

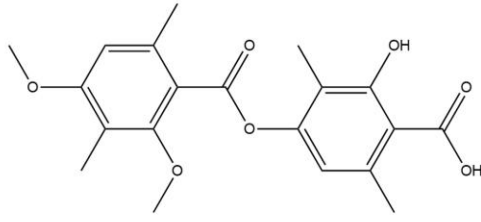
Likenlerin yapısında bulunan sekonder metabolitlerden bazılarını elde etmek amacıyla kolon kromatografi yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntem için 84 cm uzunluğunda 3,5 cm çapında cam kolonlar kullanılmıştır. Kolonlar n-hekzan ile bulamaç haline getirilmiş silika jel (70-230 mesh) ile yavaş yavaş doldurmuş ve her ilaveden sonra silika jelin çökmesi beklenmiştir. Bu sırada çözücü alt kısımdan alınmıştır. Bu şekilde kolonun 2/3'ünden fazlası doldurulmuştur. Bu işlemlerden sonra kolonlara ham ekstraktlar ilave edilmiş ve bunun üzerine ham ekstraktların dağılmasını engellemek amacıyla bir miktar silikajel ilave edilmiş ve silika jel kolon kromatografisi (SKK) işlemlerine başlanmıştır.

Düşük polariteli çözücü sistemi ile başlanarak ve belli oranlarda polarite yükseltilecek şekilde ayırma işlemleri tamamlanmıştır. Fraksiyonlar derişimlerine bağlı olarak 250-400 mL'lik hacimlerle toplanarak ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılmak suretiyle birleştirilmiştir. Birleştirilen fraksiyonlar kristallenmeye bırakılarak saflaştırılmıştır.

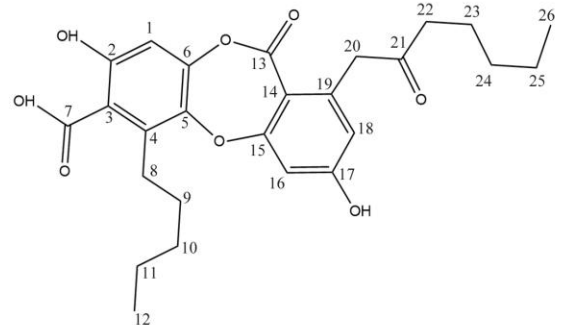
Tüm ham ekstraktlar önce metanolde çözülmüş, değişik çözücü sistemlerinde İTK yöntemi ile kontrol edilmiştir. Bu çözücü sistemleri sayesinde İTK’da oluşan renkler ve her renk için hesaplanan R_f değerleri yardımıyla SKK ile fraksiyonlama yapmak için uygun çözücü sistemleri belirlenmiştir. Bileşiklerin yapı tayininde yararlanılan $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumları CDCl_3 içinde alınmış, standart olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılmış ve kimyasal kayma değerleri (δ) ppm cinsinden belirtilmiştir.

Pseudevernia furfuracea’nın etanol ekstraktında elüsyona n-hekzan ile başlanmıştır. Etil asetatın artan oranlarında n-hekzan:etil asetat (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100) karışımı ve metanolün artan oranlarında etil asetat:metanol (90:10, 80:20, 60:40, 40:60) elüent sistemleri ile devam edilmiştir. Sonuçta 84 fraksiyon elde edilmiştir. Elde edilen tüm fraksiyonlardan örnekler alınarak bu örneklerin $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopik analizleri gerçekleştirilmiş ve analiz sonucunda elde edilen veriler *Pseudevernia furfuracea*’ya ait liken sekonder metabolitlerinden fisodik asit (Çizelge 3.3) ve olivetorik asidin (Çizelge 3.4) izole edildiğini göstermiştir (Culberson, 1969; Asahina ve Shibata, 1971). *Pseudevernia furfuracea* üzerinde gerçekleştirilen bu SKK aracılığı ile 3,42 g fisodik asit ve 4,22 g olivetorik asit elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 3.4).

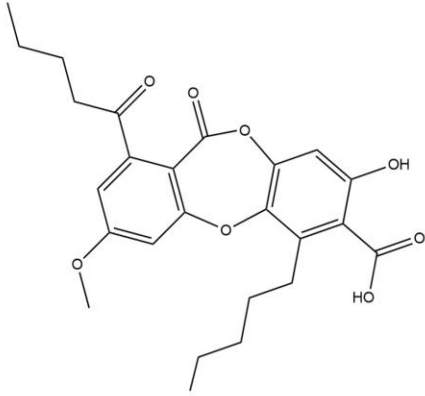
Rhizoplaca melanophthalma’nın aseton ekstraktında elüsyona diklormetan ile başlanmıştır. Etil asetatın artan oranlarında diklormetan:etil asetat (90:10, 80:20, 70:30, 50:50, 0:100) karışımı ve metanolün artan oranlarında etil asetat:metanol (90:10, 80:20, 70:30, 50:50, 0:100) elüent sistemleri ile devam edilmiştir. Sonuçta 64 fraksiyon elde edilmiştir. Elde edilen tüm fraksiyonlardan örnekler alınarak bu örneklerin $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopik analizleri gerçekleştirilmiş ve analiz sonucunda elde edilen veriler *Rhizoplaca melanophthalma*’ya ait liken sekonder metabolitlerinden psoromik asidin (Çizelge 3.5) izole edildiğini göstermiştir (Culberson, 1969; Asahina ve Shibata, 1971). *Rhizoplaca melanophthalma* üzerinde gerçekleştirilen SKK aracılığı ile 5,62 g psoromik asit elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 3.4).



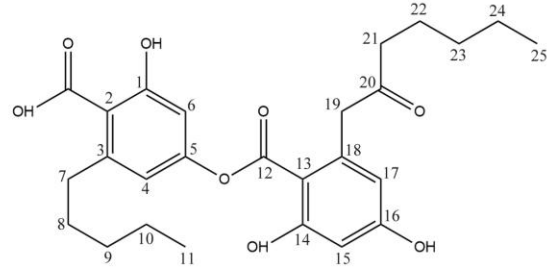
Diffraktaik Asit



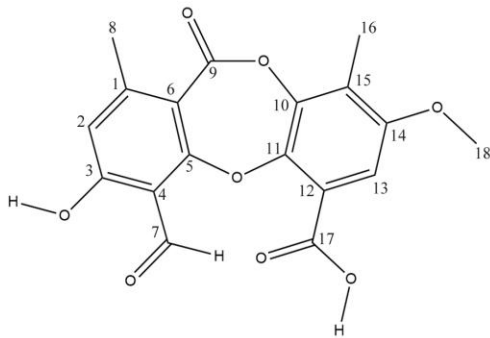
Fisodik Asit



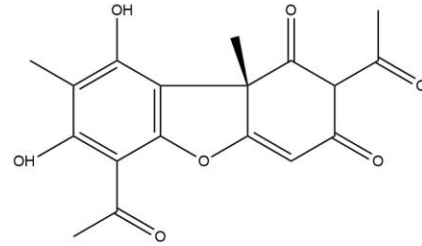
Lobarik Asit



Olivetorik Asit



Psoromik Asit



(+)-Usnik Asit

Şekil 3.4 Deneysel çalışmalarda kullanılan liken sekonder metabolitlerinin kimyasal yapıları

Çizelge 3.3 FA'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektral verileri

Konum	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	6,94	108,14
2	—	164,42
3	—	110,78
4	—	142,16
5	—	143,91
6	—	150,12
7	—	177,23
8	2,65	30,61
9	1,61	33,28
10	1,32	33,44
11	1,35	24,78
12	0,93	16,22
13	—	162,74
14	—	116,16
15	—	162,58
16	6,66	102,26
17	—	164,19
18	6,86	115,29
19	—	141,59
20	3,46	50,16
21	—	209,32
22	2,42	44,26
23	1,56	25,29
24	1,32	33,35
25	1,35	24,46
26	0,93	16,22

Çizelge 3.4 OA'nın ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektral verileri

Konum	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	—	166,95
2	—	110,52
3	—	150,23
4	7,23	118,48
5	—	156,64
6	6,96	111,92
7	2,65	39,32
8	1,61	33,92
9	1,32	34,48
10	1,35	25,74
11	0,93	17,15
12	—	174,42
13	—	108,93
14	—	168,29
15	6,18	104,92
16	—	166,87
17	6,71	115,71
18	—	144,23
19	3,46	50,19
20	—	211,16
21	2,42	45,26
22	1,55	26,29
23	1,32	34,36
24	1,35	25,41
25	0,93	17,15

Çizelge 3.5 PA'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektral verileri

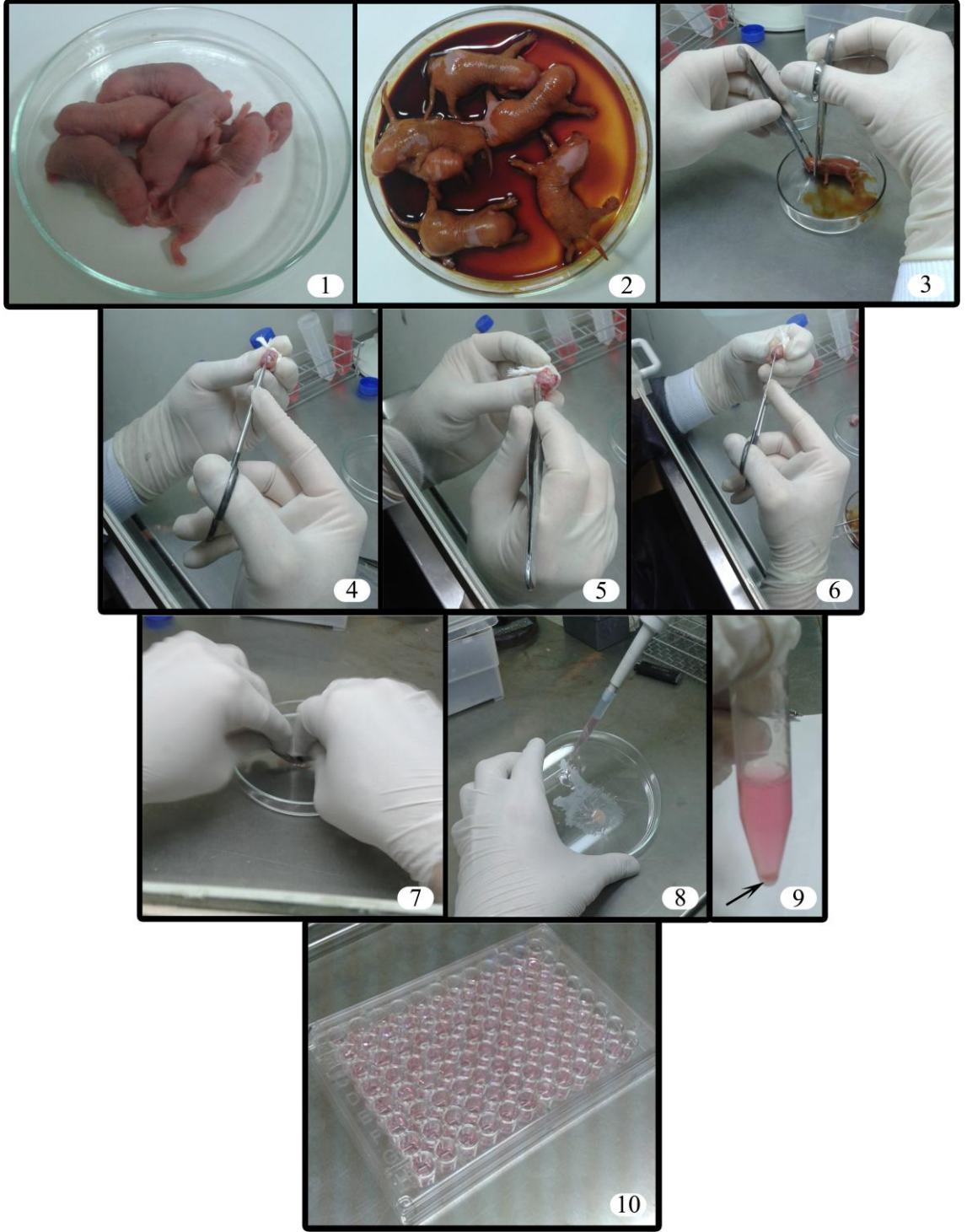
Konum	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	—	155,35
2	7,05	118,27
3	—	167,12
4	—	113,56
5	—	169,57
6	—	115,15
7	—	195,16
8	2,49	25,12
9	—	163,78
10	—	145,74
11	—	145,32
12	—	132,78
13	7,53	110,74
14	—	157,56
15	—	125,58
16	2,19	9,75
17	—	169,32
18	3,84	58,18

3.2.3. PSSK Hücre Kültürünün Hazırlanması

- 1) Altı adet yeni doğmuş (24 saatini doldurmamış) sıçan yavrusu petri kabında batikonla yıkandıktan sonra steril ortamda dekapite edilmiştir.
- 2) Steril gazlı bezle kafa kısmı tutulmak suretiyle kafa derisi soyulduktan sonra kafatası kaldırılarak ince beyin zarı da ayrıldıktan sonra korteks kısmı dikkatlice beyinden çıkarılmıştır.
- 3) Korteks kısımları, içinde HBSS bulunan tüplere konulmuş ve tüpler etüve bırakılmıştır. Daha sonra tüpler sterilizasyona dikkat edilerek etüvden alınmıştır.

- 4) Dibe çökmüş olan beyinlerin üzerindeki HBSS dökülmüştür.
- 5) Steril petri kabına alınan beyinler iki adet bistüri ile sümüksü kıvam oluşuncaya kadar 15-20 dakika süre ile makro parçalara ayrılmıştır.
- 6) Parçalanan beyin parçalarının üzerine 1,5 mL HBSS ile 0,3 mL tripsin eklenmiş ve oluşan çözelti enjektörle çekilip 15 mL'lik deney tüpüne konulmuştur.
- 7) Tüp, tripsinin mikro parçalama yapabilmesi için 35 dk CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir.
- 8) Tripsinin parçalama etkisini durdurmak amacıyla DNAaz I'in bulunduğu kabın içine, tripsin ile muamele edilen korteksler eklenmiştir.
- 9) DNAaz I'in bulunduğu kabın içine %10 oranında FBS eklenmiştir.
- 10) DNAaz I'in parçalamayı durdurarak tripsini dokulardan ayırması için 10 dk beklenmiştir.
- 11) Son çözeltinin üzerine 6 mL HBSS eklenerek 800 rpm'de 19 dk santrifüj edilmiştir.
- 12) Dibe çöken beyinlerin üzerindeki HBSS dökülerek üzerine 10 mL NBM eklenmiştir.
- 13) NBM supplementi olan B-27, 1/50 oranında eklenmiştir.
- 14) 1/1000 oranında penisilin eklenmiştir.
- 15) 96'lık plakaların her kuyucuğuna oluşan son çözeltiden 150'şer µL konulmuş ve plaka, 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakılmıştır.
- 16) Bir hafta sonra dip kısmına yapışmış hücrelerin bulunduğu her kuyucuğa hacimlerinin 1/2'si oranında, NBM + B-27 + antibiyotikten oluşan ekim ortamı eklenmiştir.
- 17) Nöron hücrelerinin flask tabanını kapladığı ve invert mikroskop altında dallı bir görünüm kazandığı gözlenmiştir.

PSSK hücre kültürünün hazırlanma basamakları şekil 3.5'te de gösterilmiştir.



Şekil 3.5 PSSK hücre kültürü hazırlama basamakları

3.2.4. U87MG Glioblastoma Hücre Kültürünün Hazırlanması

3.2.4.1. Stoktan Çıkarılan Donmuş Hücrelerin Kültürü

- 1) Hücreler sıvı nitrojen tankından (-196°C) çıkarıldıktan sonra 37°C'deki su banyosunda maksimum canlılık elde etmek için hızlı bir şekilde çözündürülmüştür.
- 2) Hücreler çözündükten sonra vial içindeki hücreler, çözeltisi ile beraber 15 mL'lik steril falkona alınmıştır.
- 3) Hücrelerin dondurulduğu sıvının içinde DMSO olduğu için hücrelerin medyum ile yıkanması gerekmektedir. Bu nedenle falkona 2 mL medyum eklenmiştir.
- 4) Falkon 5 dk +4°C'de 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 5) Steril kabin içinde süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 6) Falkona 5-10 mL medyum eklenmiş, nazikçe pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
- 7) Medyum, içerisindeki hücreler ile beraber 96'lık plakanın her kuyucuğuna 150 µL gelecek şekilde paylaştırılmıştır (Şekil 3.6).
- 8) Hücreler 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.



Şekil 3.6 U87MG hücrelerinin plakaya aktarılarak hücre kültürünün sonlandırılması

3.2.4.2. Hücrelerin Pasajlanması

İnkübe edilen hücrelerin medyumunun rengi kırmızıdan turuncuya doğru dönmeye başladığında hücreler fazla miktarda çoğalmaya başlamış demektir ve hücreler pasajlanmazsa ölmeye başlayacaktır. İlk pasajlama 48 saat sonra, diğer pasajlamalar 72 saatte bir gerçekleştirilmiştir.

- 1) Plakadaki kuyucuklarda bulunan medyum steril kabin içinde boşaltılmıştır.
- 2) 2 mL PBS flaska aktarılarak flaskın içinde kalan medyum temizlenmiş ve PBS boşaltılmıştır.
- 3) Flaska 2 mL (hücrelerin üzerini kaplayacak kadar) tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin kalkması için 2 dakika beklenmiştir.
- 4) Hücreler kalktıktan sonra flaska hafifçe vurularak hücreler çözdürülmüştür.
- 5) Tripsinin etkisini nötralize etmek amacıyla hızlı bir şekilde flaska 4 mL (flaskta bulunan tripsinin iki katı kadar) medyum eklenmiştir.
- 6) Oluşan çözelti hücreler ile beraber santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 7) Süpernatant atılmış ve pellet üzerine 4-5 mL medyum eklenerek pipetaj yapılmıştır.
- 8) Santrifüj tüpünde homojen olarak dağılan hücreler, pipet yardımıyla flasklara paylaştırılmıştır.
- 9) İvert mikroskopta hücrelere bakılmıştır.
- 10) Flasklar 37°C %5'lik CO₂ inkübatörüne yerleştirilerek inkübe edilmiştir.

3.2.4.3. Hücreleri Stoklama

- 1) Önceden kültüre edilmiş ve dondurulmak istenilen hücrelerin bulunduğu flasktaki medyum boşaltılmıştır.
- 2) 2 mL PBS flaska aktarılarak flaskın içinde kalan medyum temizlenmiş ve PBS boşaltılmıştır.
- 3) Flaska 2 mL (hücrelerin üzerini kaplayacak kadar) tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin kalkması için 2 dakika beklenmiştir.
- 4) Hücreler kalktıktan sonra flaska hafifçe vurularak hücreler çözdürülmüştür.

- 5) Tripsinin etkisini nötralize etmek amacıyla hızlı bir şekilde flaska 4 mL (flaskta bulunan tripsinin iki katı kadar) medyum eklenmiştir.
- 6) Oluşan çözelti hücreler ile beraber santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 7) Süpernatant atılmıştır.
- 8) 1,5-2 mL dondurma solusyonu (%10 DMSO, %40 medyum, %50 FBS) pellet üzerine eklenmiştir.
- 9) Tüp içerisindeki sıvı birkaç defa pipetaj yapılarak yavaşça karıştırılmıştır.
- 10) Hücreler kriotüplere aktarılarak tüpün üzerine hücre hattı ismi, tarih ve hücre sayısı yazılmıştır.
- 11) Tüp, +4°C'de 20 dakika, daha sonra -20°C'de 1 saat bekletilerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.4.4. Hücrelerin Mikroskopta Sayılması

- 1) Lamel, hemositometrenin tam ortasına gelecek şekilde yerleştirilmiştir.
- 2) 100 µl hücre, medyumla birlikte ependorf tüpüne alınmıştır.
- 3) 20 µl hücre, 20 µl tripan mavi ile birlikte başka bir ependorf tüpüne aktarılarak pipetaj yöntemi ile karıştırılmıştır (Seyreltme faktörü = 2).
- 4) 10 µl hücre-tripan mavi karışımı mikropipet ile çekilerek kılcal hareketle lamele emdirilmek suretiyle hemositometrenin her iki tarafına da yayılmıştır.
- 5) Hemositometre mikroskoba yerleştirilerek lamın üzerinde köşelerde yer alan dört geniş kare alan içerisindeki ölü ve canlı hücreler tek tek sayılmıştır. Geniş kare alanlar 10⁻⁴ mL'lik hacmi kapsamaktadır.
- 6) Ölü hücrelerin her tarafı maviye boyanırken, canlı hücreler boyanmamıştır.
- 7) Hücre sayısı ve konsantrasyonu ile ilgili hesaplamalar aşağıda verilmiştir:

$$\text{Canlı Hücre Yüzdesi} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$

$$\text{Her Bir Kare Alan İçerisindeki Ortalama Canlı Hücre Sayısı (OCHS)} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Kare Alan Sayısı (4)}}$$

$$\text{Hücre Konsantrasyonu (hücre/mL)} = \frac{\text{OCHS x Seyreltme Faktörü (2)}}{\text{Bir Kare Alanının Hacmi (10}^{-4}\text{ mL)}}$$

Toplam Hücre Sayısı = Hücre Konsantrasyonu x Hücre ile Beraber Medyum Hacmi

3.2.5. Sitotoksisite Analizleri

3.2.5.1. MTT Analizi

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin, PSSK ve U87MG hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla ticari MTT hücre proliferasyon kiti kullanılmıştır. Bu kit aracılığı ile hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve indüksiyonu üzerinde analizler gerçekleştirilir. Bu uygulamada MTT, sahip olduğu net pozitif yük ve plazma zarı potansiyeli nedeniyle hücre içerisine hareket etmekte ve hücre içindeki NAD(P)H oksidoreduktazlar tarafından mor renge sahip olan formazana indirgenmektedir (Berridge ve ark., 2005).

Kit Bileşenleri

- MTT Reaktifi
- Hücre Bazlı Deney Tampon Tableti
- Kristal Çözücü Solüsyon

Deney Tamponunun Hazırlanması

100 mL distile suda hücre bazlı deney tampon tableti çözülerek deney tampon çözeltisi oluşturulmuştur.

MTT Reaktifinin Hazırlanması

25 mg MTT reaktifi, önceden hazırlanan deney tampon çözeltisinin 5 mL'sinde çözdürülmüştür.

Uygulama

- 1) 37°C'de CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin bulunduğu plaka inkübatörden çıkarılmıştır.
- 2) Hücreler ile beraber toplam 100 µL medyumun bulunduğu kuyucukların üzerine MTT reaktifinden 10 µL eklenmiştir.
- 3) Plaka, orbital çalkalayıcı ile 1 dakika süre ile hafif bir şekilde çalkalanmıştır.
- 4) Plakada bulunan hücreler 37°C'de CO₂ inkübatöründe 4 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.
- 5) İnkübasyonun ardından, hücreler tarafından üretilen formazan, kuyucukların dibinde koyu kristaller halinde görünür hale gelmiştir.
- 6) Hücrelerin tek tabaka halindeki şekillerini korumaları amacıyla her kuyucuğun dibinde bulunan kristaller üzerindeki medyum mikropipet aracılığı ile dikkatli bir şekilde alınarak uzaklaştırılmıştır. Dibe yapışmayan hücrelerin çökmesi amacıyla medyumun uzaklaştırılması aşamasından önce plaka 400 x g'de 10 dakika sentrifüj işlemi uygulanmıştır.
- 7) Her kuyucuğa 100 µL kristal çözücü solüsyon eklenmiştir. Bu solüsyon sayesinde formazan kristalleri çözünerek kuyucukların içerisindeki çözeltinin rengi mora dönüşmüştür.
- 8) 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).
- 9) Hücre canlılığının hesaplanması aşağıdaki formül aracılığı ile gerçekleştirilmiştir:

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$



Şekil 3.7 MTT analizi sonucu plaka görünümü

3.2.5.2. LDH Salınımı Analizi

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin, PSSK ve U87MG hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstererek ortaya çıkardıkları LDH salınım seviyelerini belirlemek amacıyla ticari LDH sitotoksosite kiti kullanılmıştır.

LDH, apoptoz veya nekroz olayları esnasında meydana gelen hücre hasarı sonucunda hızla hücre kültür ortamına salınan bir enzimdir. Kit uygulamasının ilk basamağında, laktatın piruvat oksidasyonu aracılığı ile LDH, NAD^+ 'ın NADH ve H^+ 'a indirgenmesini katalizlemektedir. Reaksiyonun ikinci basamağında, diyaforaz, tetrazolyum tuzunun (INT) renkli bir bileşen olan formazana indirgenmesini katalizlemek amacıyla yeni meydana gelen NADH ve H^+ 'ı kullanmaktadır. Üretilen formazan miktarı, sitotoksitenin bir sonucu olarak kültür medyumuna salınan LDH miktarı ile orantılıdır. Ölü ya da plazma membranı hasara uğramış hücrelerin sayısının artışı kültür süpernatantında LDH aktivitesinin artışına neden olmaktadır (Haslam ve ark., 2000; Wolterbeek ve van der Meer, 2005).

Kit Bileşenleri

LDH Diaforaz

LDH NAD^+

LDH Laktik Asit

LDH Tetrazolyum Tuzu (INT)

LDH Standardı

Hücre Bazlı Deney Tampon Tableti

Deney Tamponunun Hazırlanması

100 mL distile suda hücre bazlı deney tampon tableti çözülerek deney tampon çözeltisi hazırlanmıştır.

LDH Diaforazın Hazırlanması

LDH diaforaz, önceden hazırlanan deney tampon çözeltisinin 150 μ L'sinde sulandırılmıştır.

LDH Reaksiyon Çözeltisinin Hazırlanması

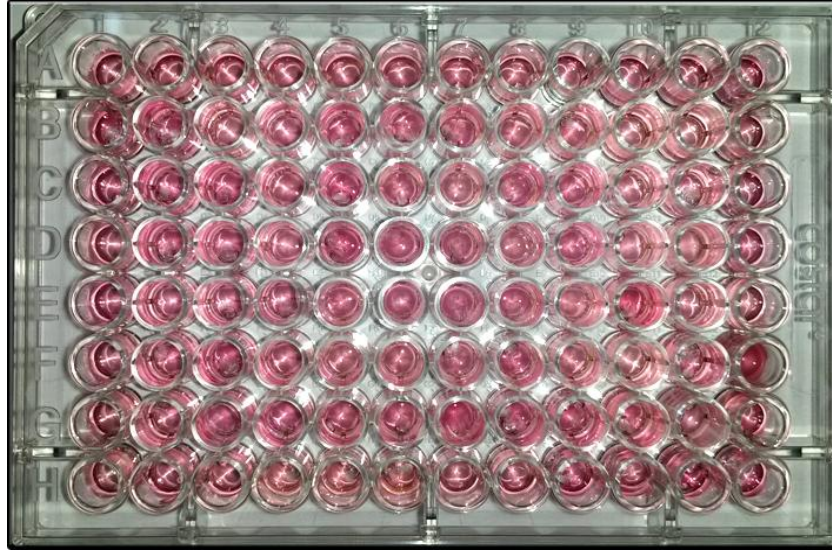
10 mL reaksiyon çözeltisi hazırlamak için 9,6 mL deney tampon çözeltisi içerisine 100'er μ L NAD^+ , laktik asit, INT ve LDH diaforaz eklenmiştir. Böylece LDH reaksiyon çözeltisi oluşturulmuştur.

LDH Standardının Hazırlanması

- 1) Kit içerisinde bulunan standart, 1,8 mL deney tamponunda çözdürülmüştür.
- 2) Altı adet deney tüpü hazırlanarak, ilgili hücre kültürü için önceden hazırlanmış taze medyumdan 475 μ L alınarak birinci tüpün içerisine, 250'şer μ L alınarak 2-6 numaralı tüplerin içerisine koyulmuştur.
- 3) 1. basamakta hazırlanan standarttan 25 μ L alınarak tüp 1'e eklenmiş ve karıştırılmıştır. Bu tüpte meydana gelen konsantrasyon " μ U/mL" cinsinden olmuştur.
- 4) 250'şer μ L çözelti tüp 1'den alınıp tüp 2'ye, tüp 2'den tüp 3'e eklenmiş ve bu şekilde tüp 5'e kadar seri seyreltme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Tüp 6'ya herhangi bir standart eklenmemiştir. Çünkü bu tüp kör olarak kullanılmıştır.
- 5) Standart konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiştir. Bu grafikten yararlanarak her kuyucukta bulunan LDH konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Uygulama

- 1) 96'lık plaka kuyucuklarından ilgili olanların içerisine yukarıda bahsedildiği gibi oluşturulan LDH standardından 100'er μL ve diğer kuyucuklara 48 saatlik inkübasyona bırakılan hücrelerin üzerindeki medyumlardan yine 100'er μL koyulmuştur.
- 2) Her kuyucuğa önceden oluşturulan LDH reaksiyon çözeltisinden 100 μL eklenmiştir.
- 3) Plaka, orbital çalkalayıcı aracılığı ile 30 dakika oda sıcaklığında hafif bir şekilde inkübe edilmiştir.
- 4) 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 LDH analizi sonucu plaka görünümü

3.2.6. Biyokimyasal Analizler

3.2.6.1. TAK Analizi

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin, PSSK ve U87MG hücreleri üzerindeki TAK seviyelerini belirlemek amacıyla ticari TAK kiti kullanılmıştır. Kitin uygulamasında amaç, kullanılan örneklerin bir serbest radikal olan 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) bileşiğinin oluşumunu inhibe etmek suretiyle

sahip oldukları antioksidan düzeylerini belirlemektir (Erel, 2004). Kit uygulaması, vitamin E analogu olan ve Troloks eşdeğeri olarak adlandırılan kararlı bir antioksidan ile kalibre edilmektedir.

Kit Bileşenleri

Reaktif Çözelti 1: İçeriğinde 50 mL, 0,4 mol/L, pH'ı 5,8 olan asetat tamponu bulunmaktadır.

Reaktif Çözelti 2: İçeriğinde toplam 10 mL, 30 mmol/L "2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)" (ABTS) bileşiği ve 0,4 mol/L, pH'ı 3,6 olan asetat tamponu karışımı bulunmaktadır.

Standart 1: Deiyonize su

Standart 2: 3 mL, 1 mmol/L "6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit" (Troloks) eşdeğeri

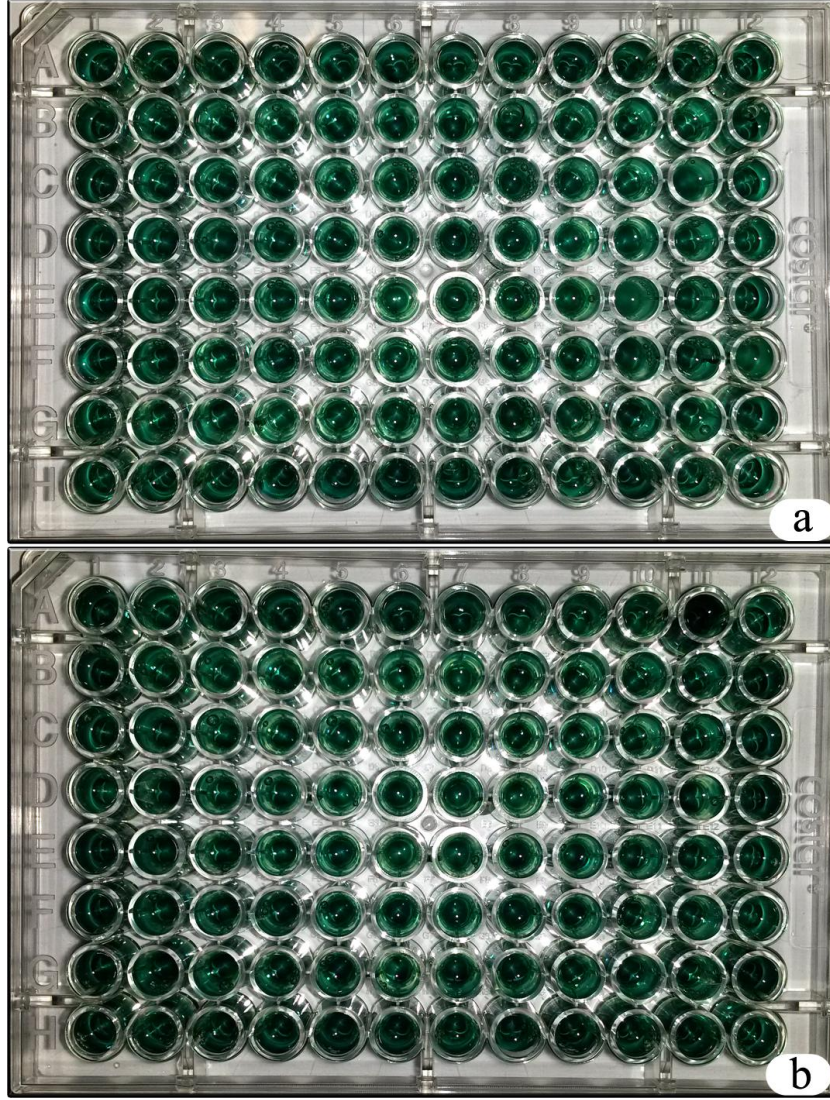
Uygulama

- 1) 48 saatlik inkübasyona bırakılan hücreler inkübatörden çıkarılmıştır. Dibe çöken hücrelerin üzerindeki medyumlardan 15 µL alınarak 96'lık plaka kuyucuklarından ilgili olanların içerisine eklenmiştir.
- 2) Standart olarak kullanılacak kuyucukların içerisine 15 µL standart 2'den koyulmuştur.
- 3) İlgili olan kuyucukların içerisine 15 µL deiyonize su koyulmuştur.
- 4) Her bir kuyucuğun içerisine 250 µL reaktif çözelti 1 eklenmiştir.
- 5) 660 nm dalga boyunda ilk spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9).
- 6) İlk okumanın ardından tüm kuyucuklara 35 µL reaktif çözelti 2 eklenmiş ve plaka 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 7) 660 nm dalga boyunda ikinci spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9).

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin, PSSK ve U87MG hücreleri üzerindeki TAK düzeyi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{mmol Troloks Eşdeğeri/L} = \frac{(\Delta\text{Standart 1 Absorbansı}) - (\Delta\text{Örnek Absorbansı})}{(\Delta\text{Standart 1 Absorbansı}) - (\Delta\text{Standart 2 Absorbansı})}$$

Δ Absorbans: İkinci Okuma Sonrası Absorbans – İlk Okuma Sonrası Absorbans



Şekil 3.9 TAK analizi sonucu plaka görünümü a) Birinci spektrofotometrik okuma sonucu; b) İkinci spektrofotometrik okuma sonucu

3.2.6.2. TOD Analizi

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin, PSSK ve U87MG hücreleri üzerindeki TOD düzeylerini belirlemek amacıyla ticari TOD kiti kullanılmıştır.

Kit uygulamasında, örnekte mevcut olan oksidan maddeler, demir iyonu içeren kompleksleri demir iyonuna oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamı içinde bol miktarda mevcut olan güçlendirici moleküller ile sürdürülmektedir. Demir iyonları asidik ortamda kromojen ile renkli bir yapı meydana getirmektedir. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilişkilidir (Erel, 2005). Kit uygulaması hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edilmektedir.

Kit Bileşenleri

Reaktif Çözelti 1: İçeriğinde 50 mL, 25 mM, pH'ı 1,75 olan H_2SO_4 tamponu bulunmaktadır.

Reaktif Çözelti 2: İçeriğinde toplam 8 mL, 5mM demir iyonu, 10 mM o-dianizidin ve 25 mM, pH'ı 1,75 olan H_2SO_4 tamponu karışımı bulunmaktadır.

Standart: 3 mL, 800 mM H_2O_2 eşdeğeri

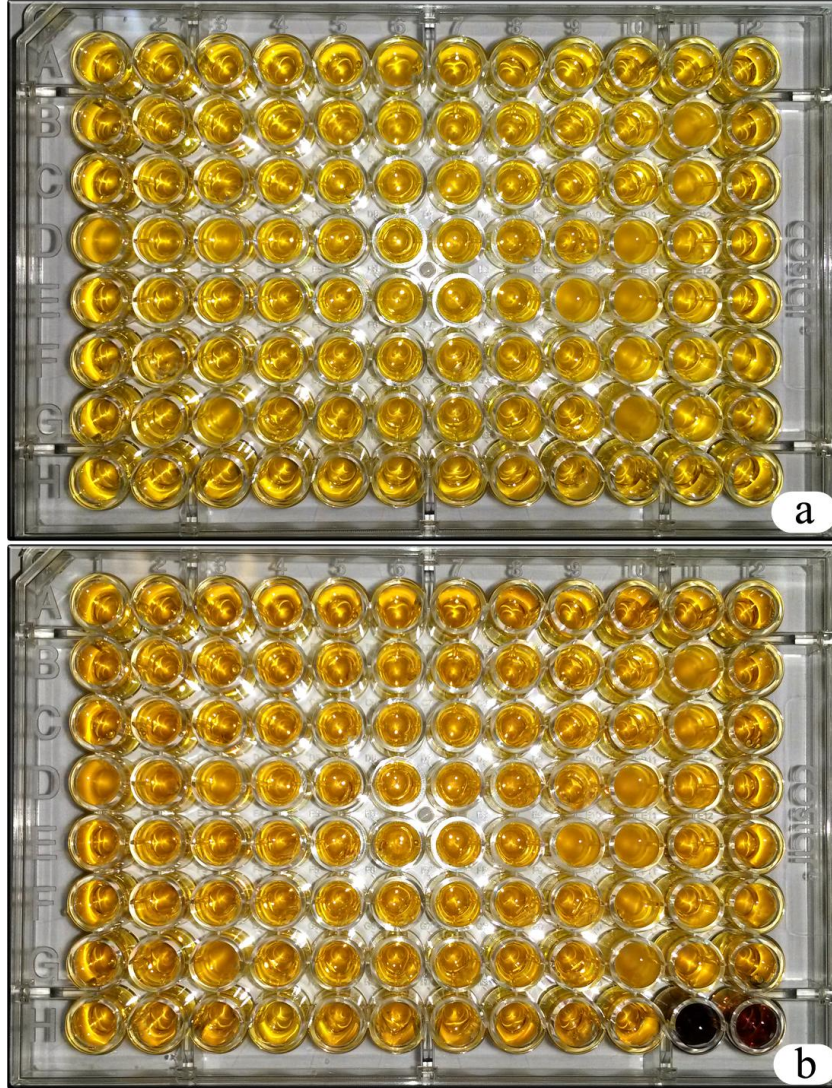
Uygulama

- 1) 48 saatlik inkübasyona bırakılan hücreler inkübatörden çıkarılmıştır. Dibe çöken hücrelerin üzerindeki medyumlardan 38 μ L alınarak 96'lık plaka kuyucuklarından ilgili olanların içerisine eklenmiştir.
- 2) Standart olarak kullanılacak kuyucukların içerisine 38 μ L standart koyulmuştur.
- 3) Her bir kuyucuğun içerisine 250 μ L reaktif çözelti 1 eklenmiştir.
- 4) 530 nm dalga boyunda ilk spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10).
- 5) İlk okumanın ardından tüm kuyucuklara 12 μ L reaktif çözelti 2 eklenmiş ve plaka 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 6) 530 nm dalga boyunda ikinci spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10).

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin, PSSK ve U87MG hücreleri üzerindeki TOD düzeyi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eşdeğeri/L} = \frac{(\Delta\text{Örnek Absorbansı})}{(\Delta\text{Standart Absorbansı})} \times \text{Standart Konsantrasyonu (20 } \mu\text{mol/L)}$$

Δ Absorbans: İkinci Okuma Sonrası Absorbans – İlk Okuma Sonrası Absorbans



Şekil 3.10 TOD analizi sonucu plaka görünümü a) Birinci spektrofotometrik okuma sonucu; b) İkinci spektrofotometrik okuma sonucu

3.2.7. Oksidatif DNA Hasar Analizi

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin, PSSK ve U87MG hücrelerinin DNA yapıları üzerinde oksidatif hasara neden olarak ortaya çıkardıkları 8-OH-dG seviyelerini belirlemek amacıyla ticari DNA/RNA oksidatif hasar kiti kullanılmıştır.

Kit uygulamasında amaç, sekonder metabolitlere maruz bırakılan hücrelerde, oksidasyona uğramış guanin bazı olan 8-OH-dG miktarının hesaplanması aracılığı ile hücrelerde oksidatif DNA hasarının belirlenmesidir (Gan ve ark., 2012).

Kit Bileşenleri

DNA/RNA Oksidatif Hasar Enzim İmmün Testi (EIA) Monoklonal Antikoru

DNA/RNA Oksidatif Hasar Asetilkolinesteraz (AChE) İzleyici

DNA/RNA Oksidatif Hasar EIA Standardı

EIA Tampon Konsantresi

Su Tampon Konsantresi

Polisorbat 20

Ellman Reaktifi (5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit))

EIA İzleyici Boyası

EIA Antiserum Boyası

EIA Tamponunun Hazırlanması

EIA tampon konsantresi 90 mL ultra saf suda çözülerek EIA tamponu hazırlanmıştır.

Yıkama Tamponunun Hazırlanması

2 L ultra saf suda 5 mL yıkama tampon konsantresi seyreltilmiş ve oluşan çözelti üzerine 1 mL polisorbat 20 eklenerek yıkama tamponu hazırlanmıştır.

DNA/RNA Oksidatif Hasar AChE İzleyicinin Hazırlanması

6 mL EIA tamponu ile DNA/RNA oksidatif hasar AChE izleyici sulandırılmıştır.

DNA/RNA Oksidatif Hasar EIA Monoklonal Antikoruun Hazırlanması

6 mL EIA tamponu ile DNA/RNA oksidatif hasar EIA monoklonal antikoru sulandırılmıştır.

Ellman Reaktifinin Hazırlanması

50 mL ultra saf su ile Ellman Reaktifi sulandırılmıştır.

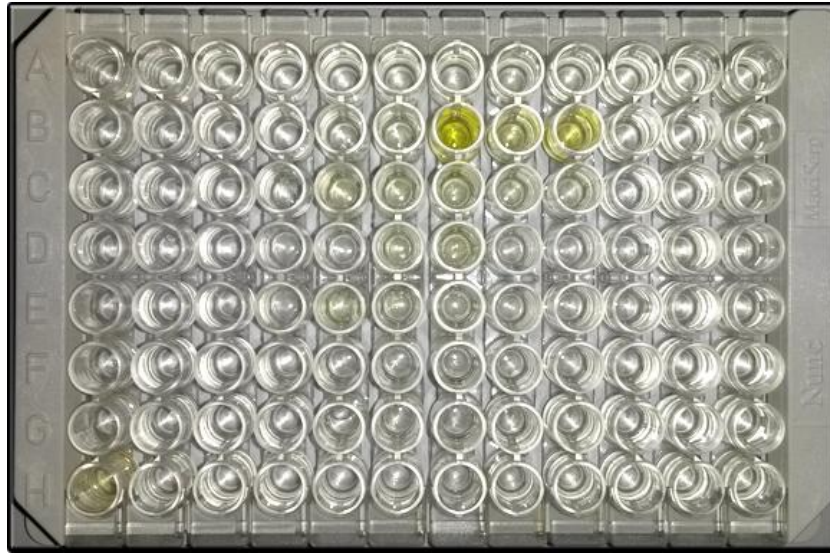
DNA/RNA Oksidatif Hasar EIA Standardının Hazırlanması

- 1) 100 µL DNA/RNA oksidatif hasar EIA standardı, 900 µL ultra saf su ile çözülmüştür. Böylece 30 ng/mL konsantrasyona sahip stok çözelti oluşturulmuştur.
- 2) Sekiz adet deney tüpü hazırlanarak, ilgili hücre kültürü için önceden hazırlanmış taze medyumdan 900 µL alınarak birinci tüpün içerisine, 500'er µL alınarak 2-8 numaralı tüplerin içerisine koyulmuştur.
- 3) 1. basamakta oluşturulan stok çözeltiden 100 µL alınarak tüp 1'e eklenmiş ve karıştırılmıştır.
- 4) 400'er µL çözelti tüp 1'den alınıp tüp 2'ye, tüp 2'den tüp 3'e eklenmiş ve bu şekilde tüp 8'e kadar seri seyreltme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Uygulama

- 1) Plakadaki kuyucuklara eklemeler, kit içerisinde verilen örnek 96'lık plaka formatına göre gerçekleştirilmiştir. Kuyucuk tanımlamaları; Blk (Kör), TA (Toplam Aktivite), NSB (Spesifik Olmayan Tespit) ve B₀ (Maksimum Tespit) şeklinde yapılmıştır.
- 2) NSB kuyucuklarına 50 µL taze kültür medyumunu, 50 µL EIA tamponu ve 50 µL DNA/RNA oksidatif hasar AChE izleyici eklenmiştir.
- 3) B₀ kuyucuklarına 50 µL taze kültür medyumunu, 50 µL DNA/RNA oksidatif hasar AChE izleyici ve 50 µL DNA/RNA oksidatif hasar EIA monoklonal antikorunu eklenmiştir.
- 4) Standart kuyucuklarına 50 µL önceden hazırlanan ve ilgili seyreltmeler gerçekleştirilerek oluşturulan DNA/RNA oksidatif hasar EIA standartları, 50 µL DNA/RNA oksidatif hasar AChE izleyici ve 50 µL DNA/RNA oksidatif hasar EIA monoklonal antikorunu eklenmiştir.
- 5) Örnek kuyucuklarına 50 µL 48 saatlik inkübasyona bırakılan hücrelerin üzerindeki medyumlarından, 50 µL DNA/RNA oksidatif hasar AChE izleyici ve 50 µL DNA/RNA oksidatif hasar EIA monoklonal antikorunu eklenmiştir.
- 6) Yukarıdaki basamakları geçerek hazırlanan 96'lık plaka, kit ile beraber verilen plastik film ile kaplanarak 4°C'de 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.
- 7) İnkübasyonun ardından plakadaki kuyucuklarda bulunan sıvılar boşaltılmış ve beş kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- 8) Her kuyucuğa 200 µL Ellman reaktifi eklenmiştir.
- 9) TA kuyucuğuna 50 µL "DNA/RNA oksidatif hasar AChE izleyici" eklenmiştir.

- 10) Plaka plastik film ile kaplanarak karanlık ortamda orbital çalkalayıcı aracılığı ile 90-120 dakika arası çalkalama işlemine tabi tutulmuştur.
- 11) Plakadaki B_0 kuyucuğundaki örneklerin ortalama absorbans değeri 0,3-1 arasında olana kadar 405-420 nm dalga boyu aralığında ölçümler gerçekleştirilmiştir.
- 12) En iyi absorbans değerinin 405 nm dalga boyunda olduğu görülmüştür (Şekil 3.11).
- 13) Elde edilen absorbans değerleri ile kitin uygulama prosedürü baz alınarak yapılan hesaplamalar sonucu her kuyucukta bulunan 8-OH-dG konsantrasyonu hesaplanmıştır.



Şekil 3.11 Oksidatif DNA hasar analizi sonucu plaka görünümü

3.2.8. Verilerin Analizi

Uygulamalar neticesinde ortaya çıkan sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 21.0 istatistik veri paketi aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde (%95 güven aralığında) post-hoc Duncan çoklu karşılaştırma testinden, değişkenler arasındaki ilişki seviyelerinin tespit edilmesinde ikili korelasyon analizinden ve IC_{50} değerlerinin hesaplanması amacıyla probit analizinden yararlanılmıştır. Grafik çizimleri GraphPad Prism 6.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

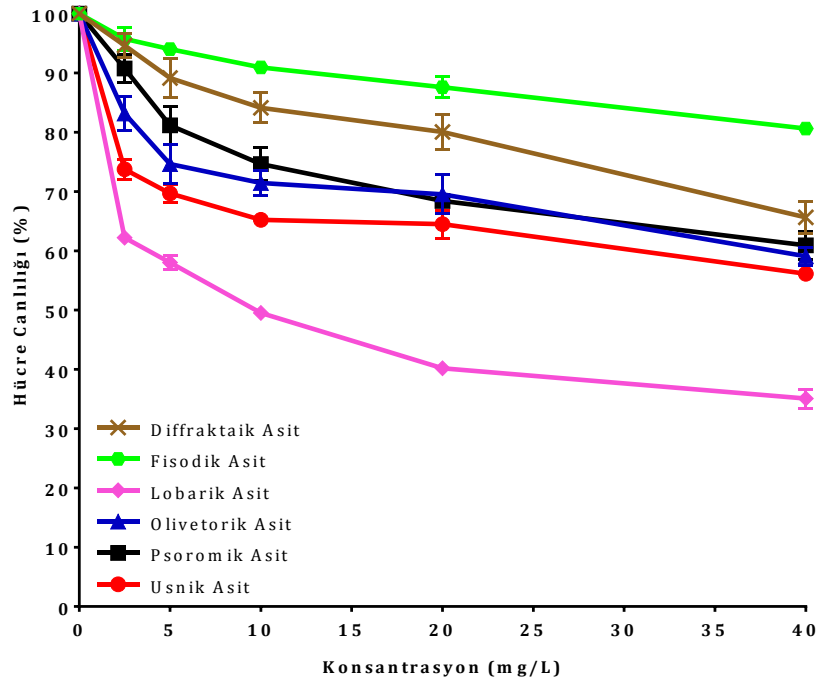
4. BULGULAR

4.1. Sitotoksisite Analizleri

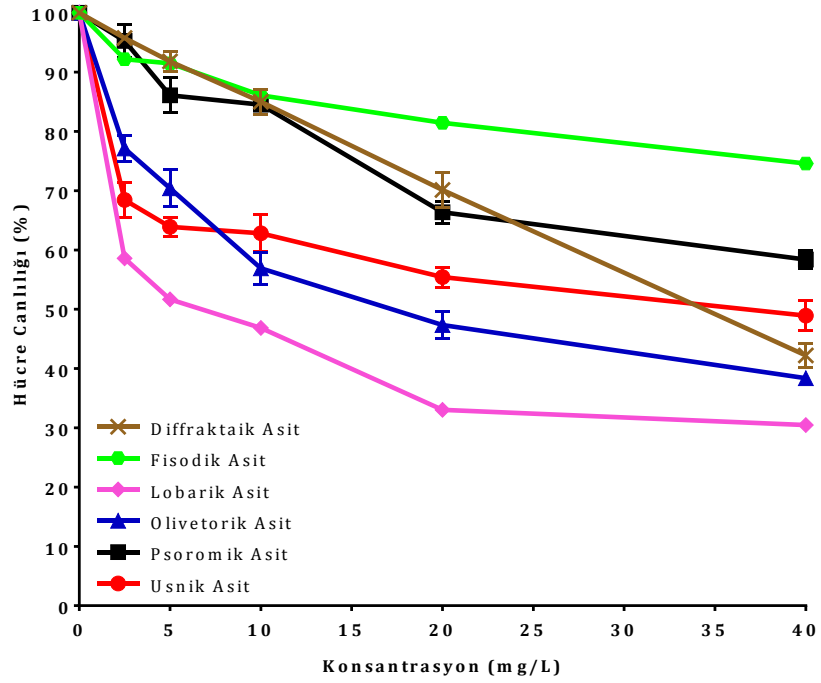
4.1.1. MTT Analizi ile Hücrelerde Canlılık Oranının Test Edilmesi

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin farklı konsantrasyonları (2,5, 5, 10, 20 ve 40 mg/L) ile muamele edilen PSSK (Şekil 4.1) ve U87MG (Şekil 4.2) hücrelerinin 48 saat sonraki canlılık oranları MTT analizi aracılığı ile tespit edilmiştir. Araştırma sonuçları göstermiştir ki test edilen tüm liken sekonder metabolit uygulamaları içerisinde hücre proliferasyonunu en fazla inhibe eden çözeltiler en yüksek konsantrasyonlu (40 mg/L) olanlardır. Elde edilen sonuçlara göre PSSK ve U87MG hücrelerinde canlılık oranını en fazla düşüren metabolitin LA olduğu belirlenmiştir. LA'nın maksimum konsantrasyonuna (40 mg/L) maruz kalan PSSK hücrelerinde canlılık yüzdesi %35,09'a düşerken, U87MG hücrelerinde bu oran %30,47'dir. UA'nın maksimum konsantrasyonlu çözeltisi PSSK hücrelerinin %56,14'ü, U87MG hücrelerinin ise %48,91'i üzerinde öldürücü etki göstermemiştir. OA metabolitinin 40 mg/L'lik konsantrasyonu PSSK hücrelerinin %40,91'inin proliferasyonunu inhibe ederken, U87MG hücrelerinin %61,64'ünde sitotoksik etki göstermiştir. Her iki hücre çeşidi üzerinde en düşük sitotoksik etkiyi gösteren metabolit FA olmuştur. FA, maksimum konsantrasyonlu çözeltisinde PSSK hücrelerinin %80,63'ü, U87MG hücrelerinin ise %74,57'si üzerinde letal etki göstermemiştir.

Test edilen liken metabolitlerinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan PSSK ve U87MG hücreleri üzerinde, bu metabolitlerin 48 saat sonraki IC₅₀ değerleri probit analizi aracılığı ile belirlenmiştir. PSSK ve U87MG hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri test edilen bileşikler, IC₅₀ değerleri baz alınarak kıyaslandığında PSSK hücreleri için sıralama LA < PA < DA < OA < UA < FA şeklinde (Çizelge 4.1), U87MG hücreleri için sıralama LA < OA < DA < UA < PA < FA şeklinde (Çizelge 4.2) meydana gelmiştir. Her iki hücre türü için hesaplanan IC₅₀ değerlerinin istatistiksel açıdan ($p < 0,05$) birbirlerinden farklı oldukları da çalışma sonuçlarına yansımıştır.



Şekil 4.1 Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen PSSK hücrelerinde MTT analizi sonucu elde edilen canlılık oranları (Ortalama \pm Standart Sapma, $n = 3$)



Şekil 4.2 Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen U87MG hücrelerinde MTT analizi sonucu elde edilen canlılık oranları (Ortalama \pm Standart Sapma, $n = 3$)

Çizelge 4.1 Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen PSSK hücreleri için tespit edilen IC₅₀ değerleri (mg/L)

Metabolit	IC ₅₀ (Sınırlar)	Eğim ± Standart Hata (Sınırlar)	X ²
Diffraktaik Asit	122,26 ^c (80,65-225,20)	0,94 ± 0,10 (0,74-1,13)	11,71
Fisodik Asit	698,19 ^f (271,52-3925,03)	0,72 ± 0,11 (0,50-0,94)	3,51
Lobarik Asit	9,08 ^a (7,03-11,60)	0,61 ± 0,08 (0,46-0,76)	1,54
Olivetorik Asit	125,71 ^d (67,35-384,96)	0,53 ± 0,08 (0,37-0,69)	7,67
Psoromik Asit	79,40 ^b (54,15-139,73)	0,80 ± 0,09 (0,63-0,97)	8,14
Usnik Asit	132,69 ^e (57,97-902,79)	0,37 ± 0,08 (0,21-0,52)	2,42

Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.

Çizelge 4.2 Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen U87MG hücreleri için tespit edilen IC₅₀ değerleri (mg/L)

Metabolit	IC ₅₀ (Sınırlar)	Eğim ± Standart Hata (Sınırlar)	X ²
Diffraktaik Asit	35,67 ^c (31,01-42,15)	1,66 ± 0,11 (1,46-1,87)	13,25
Fisodik Asit	410,72 ^f (182,89-1704,22)	0,67 ± 0,10 (0,48-0,86)	2,17
Lobarik Asit	5,77 ^a (4,27-7,34)	0,64 ± 0,08 (0,49-0,80)	3,18
Olivetorik Asit	17,55 ^b (14,67-21,67)	0,89 ± 0,08 (0,73-1,05)	3,49
Psoromik Asit	56,22 ^e (44,13-77,32)	1,16 ± 0,10 (0,98-1,35)	13,33
Usnik Asit	41,55 ^d (25,42-105,55)	0,41 ± 0,08 (0,26-0,56)	7,32

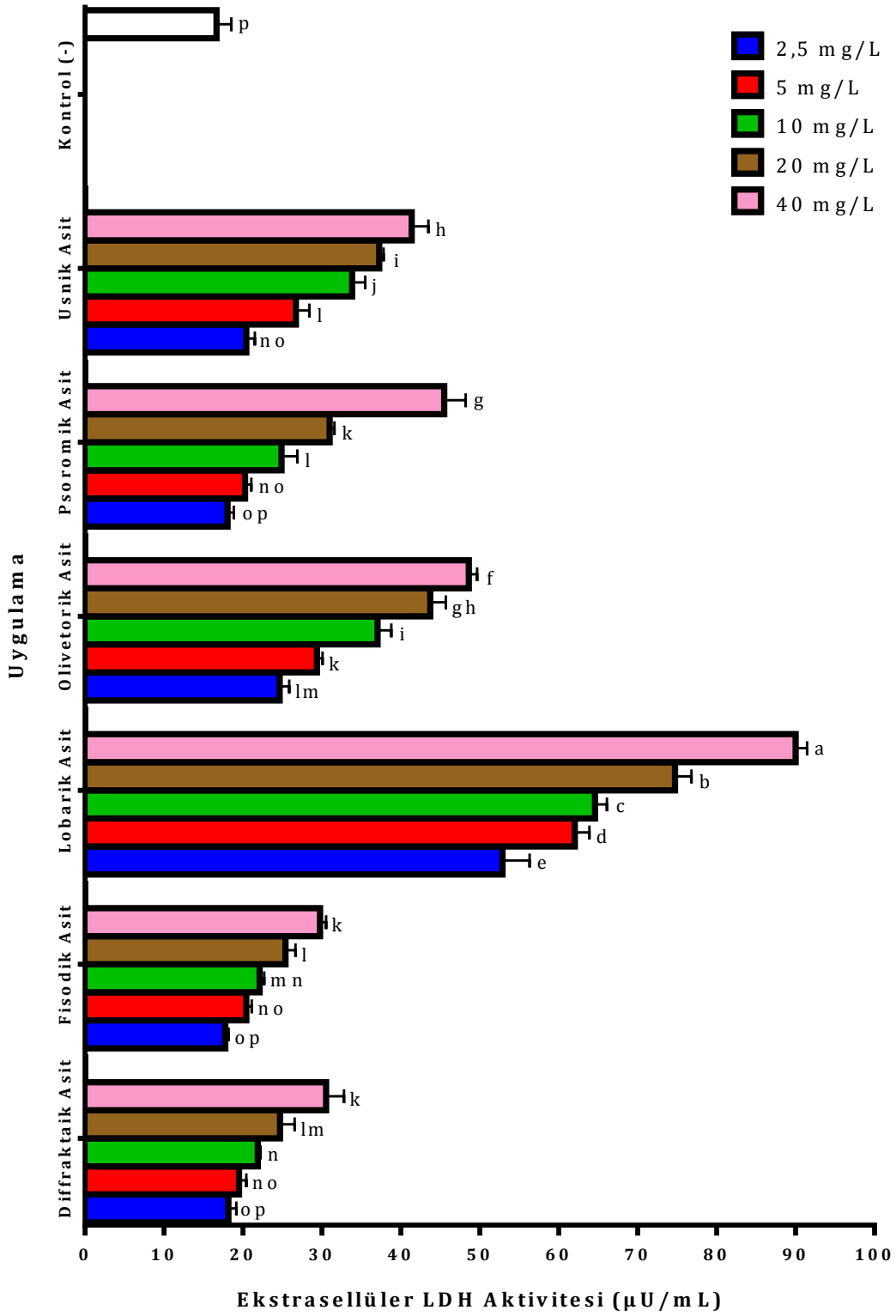
Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.

4.1.2. LDH Salınımı Analizi ile Metabolitlerin Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

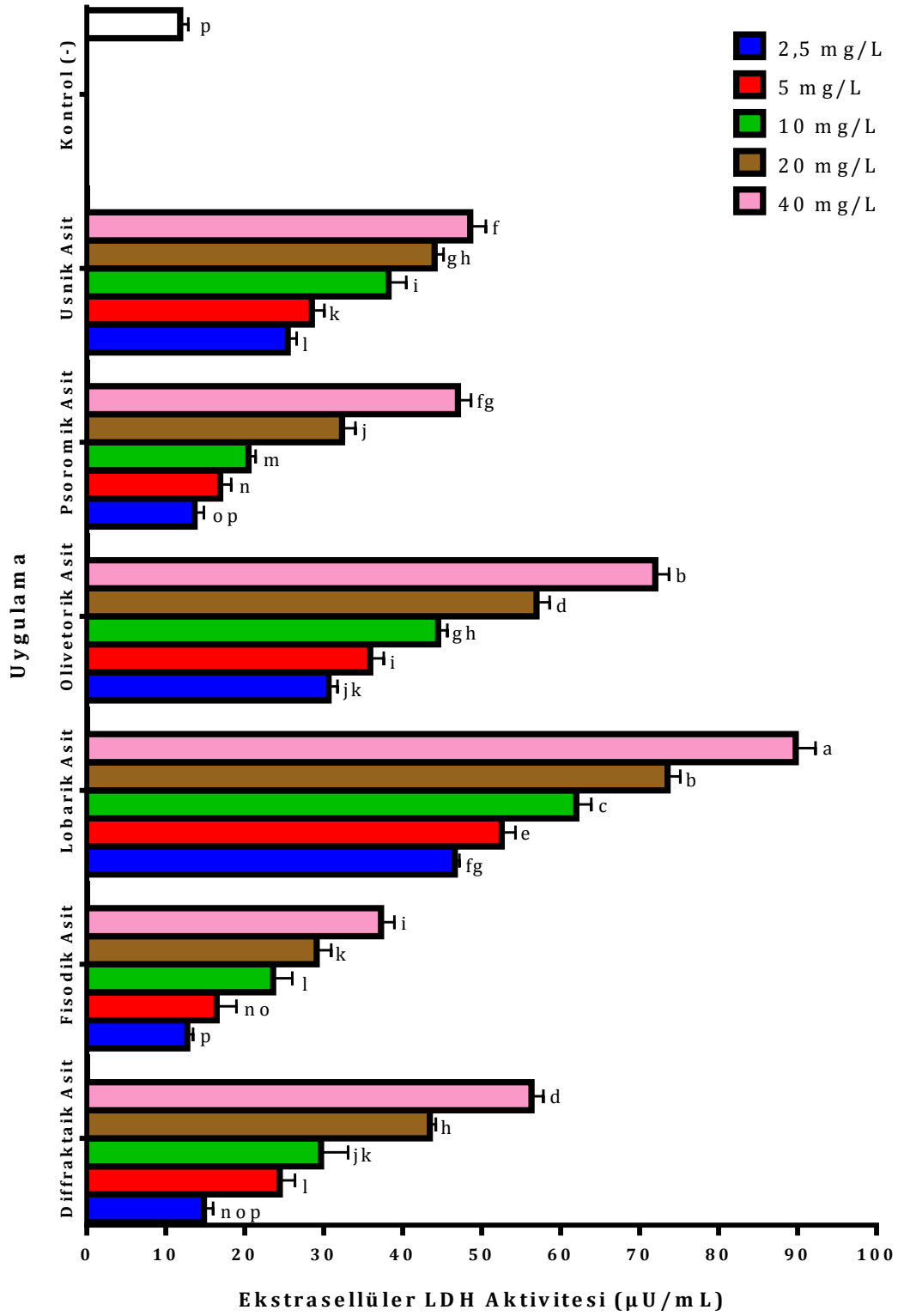
DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin farklı konsantrasyonlarının (2,5, 5, 10, 20 ve 40 mg/L) uygulamadan 48 saat sonra, PSSK (Şekil 4.3) ve U87MG (Şekil 4.4) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla LDH salınım testinden yararlanılmıştır.

Hücre kültürü medyumunda bulunan LDH miktarı hücre zarının bütünlüğü hakkında fikir vermektedir. Bu nedenle zarı hasara uğramış bir hücrenin medyumunda fazla oranda LDH enzimi bulunacağı göz önüne alınarak yapılan çalışmada, en yüksek konsantrasyona (40 mg/L) sahip metabolit çözeltilerinin en fazla LDH salınımına sebep olduğu görülmüştür. PSSK ve U87MG hücre medyumlarında en fazla LDH konsantrasyonu (Sırasıyla 90,00 ve 89,77 $\mu\text{U}/\text{mL}$), 40 mg/L konsantrasyona sahip LA uygulamasında tespit edilmiştir. PSSK hücreleri üzerinde, LA'nın en düşük konsantrasyonunun (2,5 mg/L) diğer metabolitlerin tüm konsantrasyonlarına kıyasla daha yüksek oranda LDH salınımına (52,89 $\mu\text{U}/\text{mL}$) sebep olduğu dikkat çekmektedir. PSSK hücreleri üzerinde OA, PA ve UA metabolitlerinin en yüksek konsantrasyonlarının sırasıyla 48,61, 45,50 ve 41,39 $\mu\text{U}/\text{mL}$ 'lik LDH salınımlarına sebep olmaları nedeniyle yakın seviyede LDH aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. U87MG hücreleri üzerinde LA'dan sonra en fazla LDH salınımına sebep olan metabolit OA olmuştur. OA metabolitinin 20 ve 40 mg/L'lik konsantrasyonlu çözeltileri sırasıyla 56,94 ve 72,00 $\mu\text{U}/\text{mL}$ LDH aktivite göstermek suretiyle kontrol grubuna da kıyasla U87MG hücreleri üzerinde yüksek oranda sitotoksik etkiye sebep olmuştur.

Şekil 4.3 ve şekil 4.4'e bakıldığında DA, FA ve PA'nın 2,5 mg/L'lik konsantrasyonlu çözeltilerinin PSSK ve U87MG hücreleri üzerinde gösterdikleri LDH aktivitelerinin, kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan ($p > 0,05$) bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3 Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen PSSK hücrelerinde gözlenen LDH salınım seviyesi (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)



Şekil 4.4 Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen U87MG hücrelerinde gözlenen LDH salınım seviyesi (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

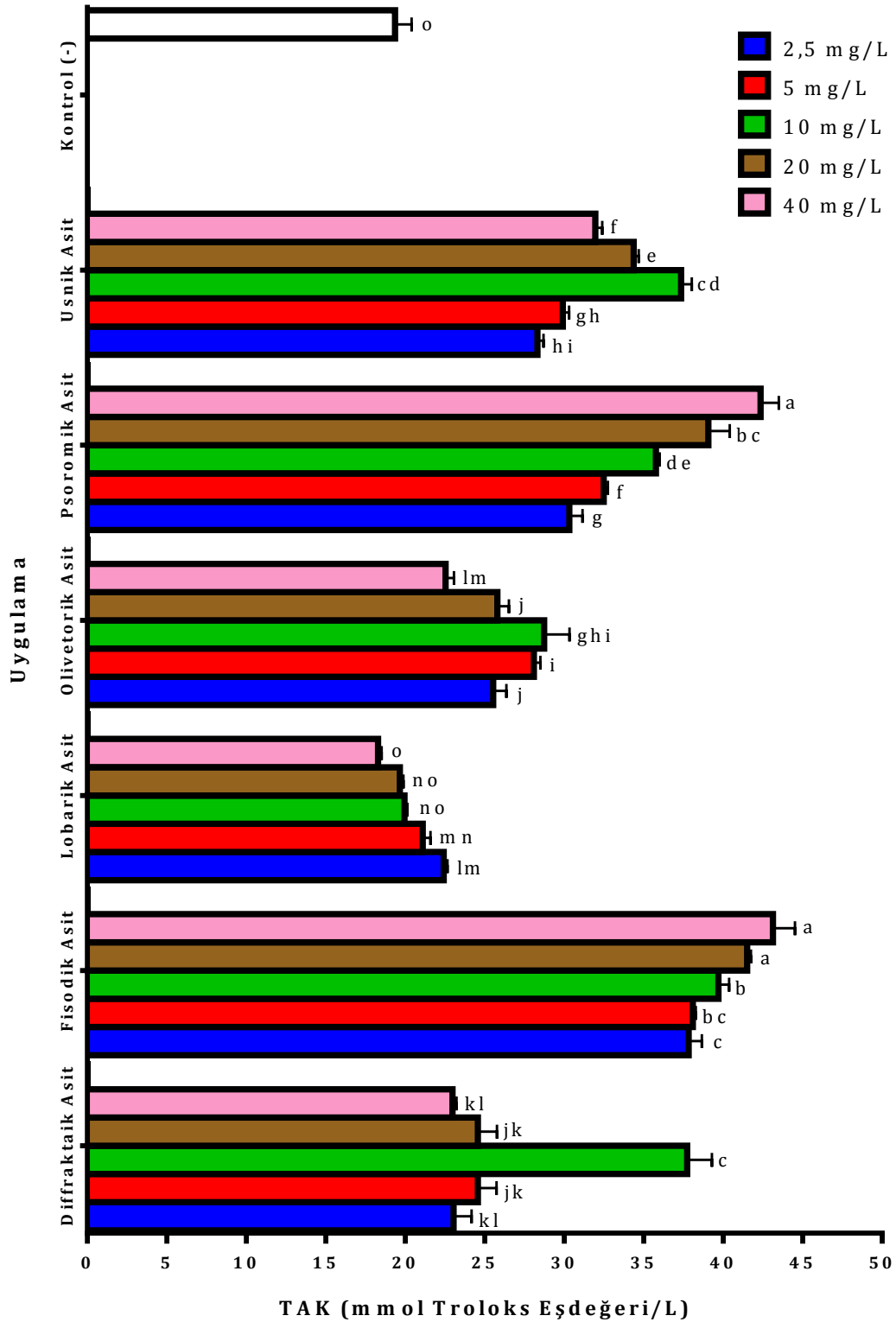
4.2. Biyokimyasal Analizler

4.2.1. Metabolitlerin *In Vitro* Koşullarda Oluşturduğu TAK Düzeylerinin Belirlenmesi

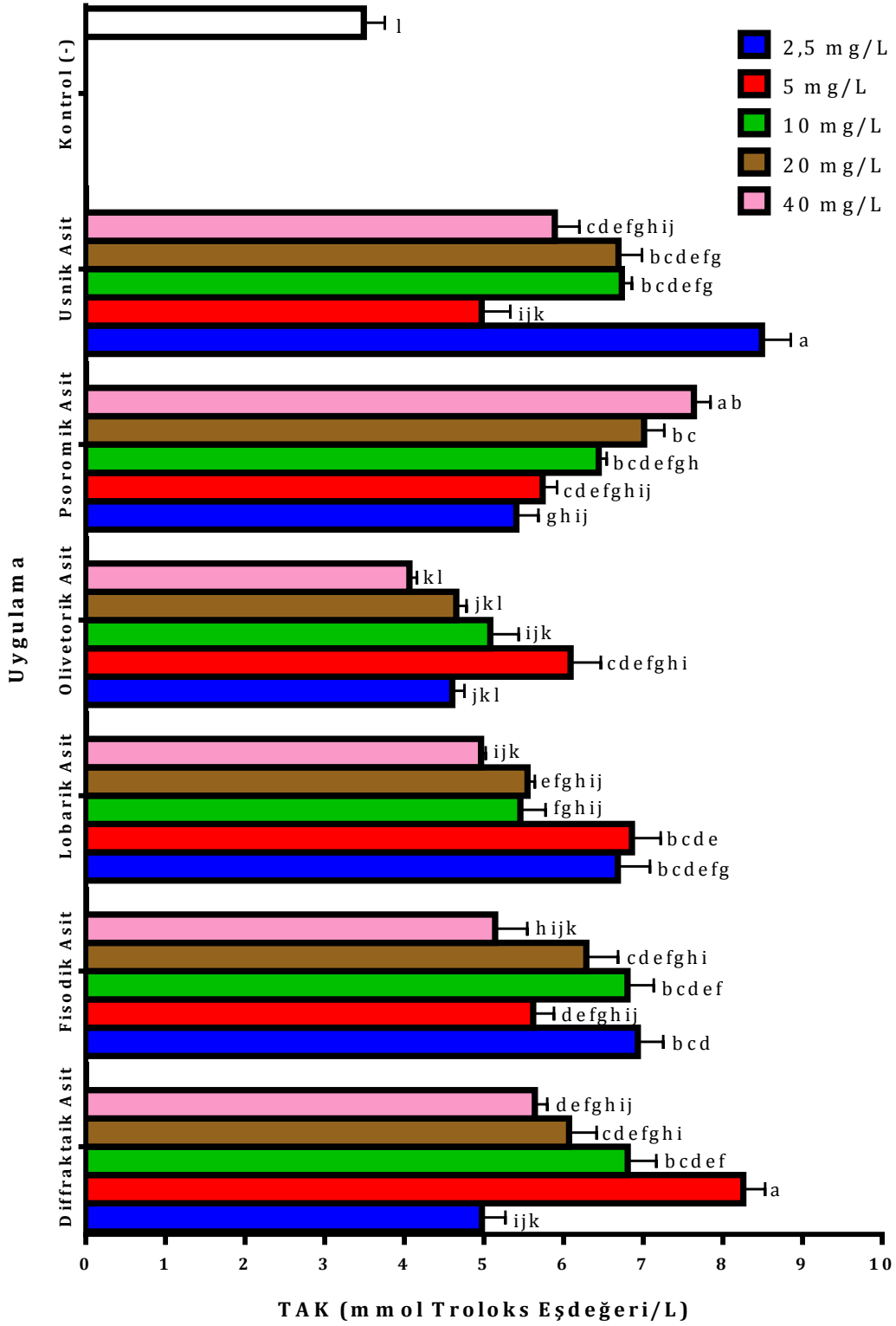
DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin farklı konsantrasyonlarının (2,5, 5, 10, 20 ve 40 mg/L) uygulamadan 48 saat sonra, PSSK (Şekil 4.5) ve U87MG (Şekil 4.6) hücreleri üzerindeki toplam antioksidan kapasitelerini belirlemek amacıyla TAK analizinden yararlanılmıştır.

Metabolitlerin PSSK hücreleri üzerindeki TAK düzeylerine bakıldığında, en yüksek oranların 43,13 mmol Troloks Eşdeğeri/L ile FA'nın ve 42,34 mmol Troloks Eşdeğeri/L ile PA'nın maksimum konsantrasyonlardaki çözeltilerinde ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca FA'nın 20 mg/L'lik konsantrasyona sahip çözeltilisinin TAK düzeyinin de (41,51 mmol Troloks Eşdeğeri/L) en yüksek TAK değerlerinden istatistiki olarak ($p > 0,05$) farklı olmadığı belirlenmiştir. DA ve UA'nın 10 mg/L'lik konsantrasyona sahip çözeltilerinin sahip oldukları TAK düzeyleri (Sırasıyla 37,74 ve 37,34 mmol Troloks Eşdeğeri/L) de deneme sonuçlarının göze çarpan değerlerinden olmuştur. En düşük TAK oranlarına sahip olan metabolitin ise LA olduğu saptanmıştır. Ayrıca LA metabolitinin 10, 20 ve 40 mg/L konsantrasyona sahip çözeltilerinin PSSK hücreleri üzerinde sahip oldukları TAK düzeyleri ile kontrol grubu TAK düzeyi arasındaki farkın %95 güven aralığında anlamlı olmadığı çalışma sonuçlarına yansımıştır (Şekil 4.5).

Metabolitlerin U87MG hücreleri üzerindeki TAK düzeyleri incelendiğinde, tüm metabolit konsantrasyonlarının sahip oldukları TAK değerlerinin birbirlerine yakın oldukları göze çarpmaktadır. DA'nın 5 mg/L ve UA'nın 2,5 mg/L'lik konsantrasyonlu çözeltilerinin sahip oldukları TAK düzeyleri (Sırasıyla 8,25 ve 8,49 mmol Troloks Eşdeğeri/L) denemenin en yüksek değerlerini temsil etmiştir. OA'nın 2,5, 20 ve 40 mg/L'lik konsantrasyonlu çözeltilerinin TAK oranları ise (Sırasıyla 4,60, 4,65 ve 4,06 mmol Troloks Eşdeğeri/L) denemenin en düşük değerlerini göstermiş ve bu değerler ile kontrol grubu TAK değeri (3,49 mmol Troloks Eşdeğeri/L) arasındaki fark istatistiksel açıdan ($p > 0,05$) anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 PSSK hücreleri üzerinde test edilen farklı liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu TAK düzeyleri (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)



Şekil 4.6 U87MG hücreleri üzerinde test edilen farklı liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu TAK düzeyleri (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

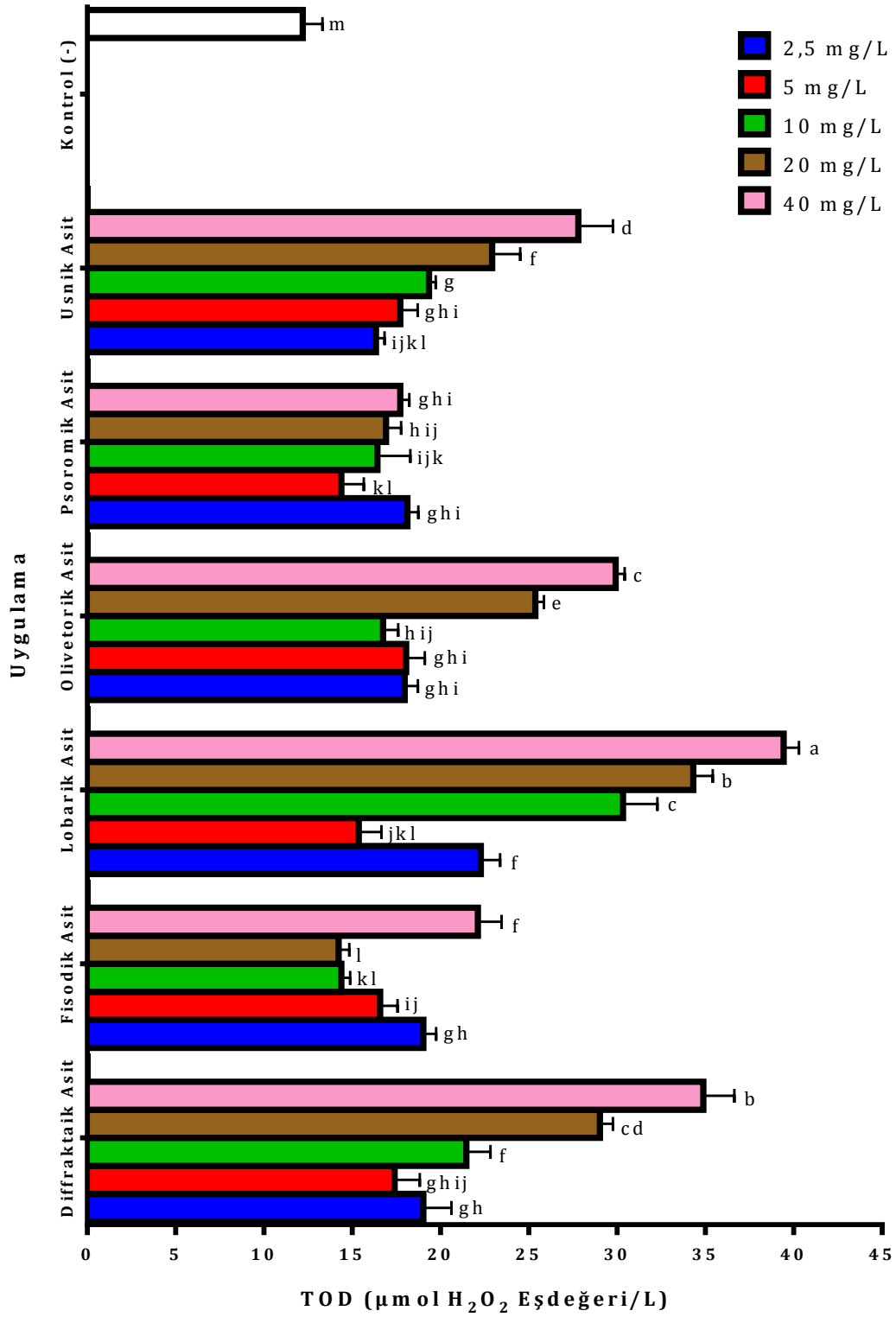
4.2.2. Metabolitlerin *In Vitro* Koşullarda Oluşturduğu TOD Düzeylerinin Belirlenmesi

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin farklı konsantrasyonlarının (2,5, 5, 10, 20 ve 40 mg/L) uygulamadan 48 saat sonra, PSSK (Şekil 4.7) ve U87MG (Şekil 4.8) hücreleri üzerindeki toplam oksidan durumlarını belirlemek amacıyla TOD analizinden yararlanılmıştır.

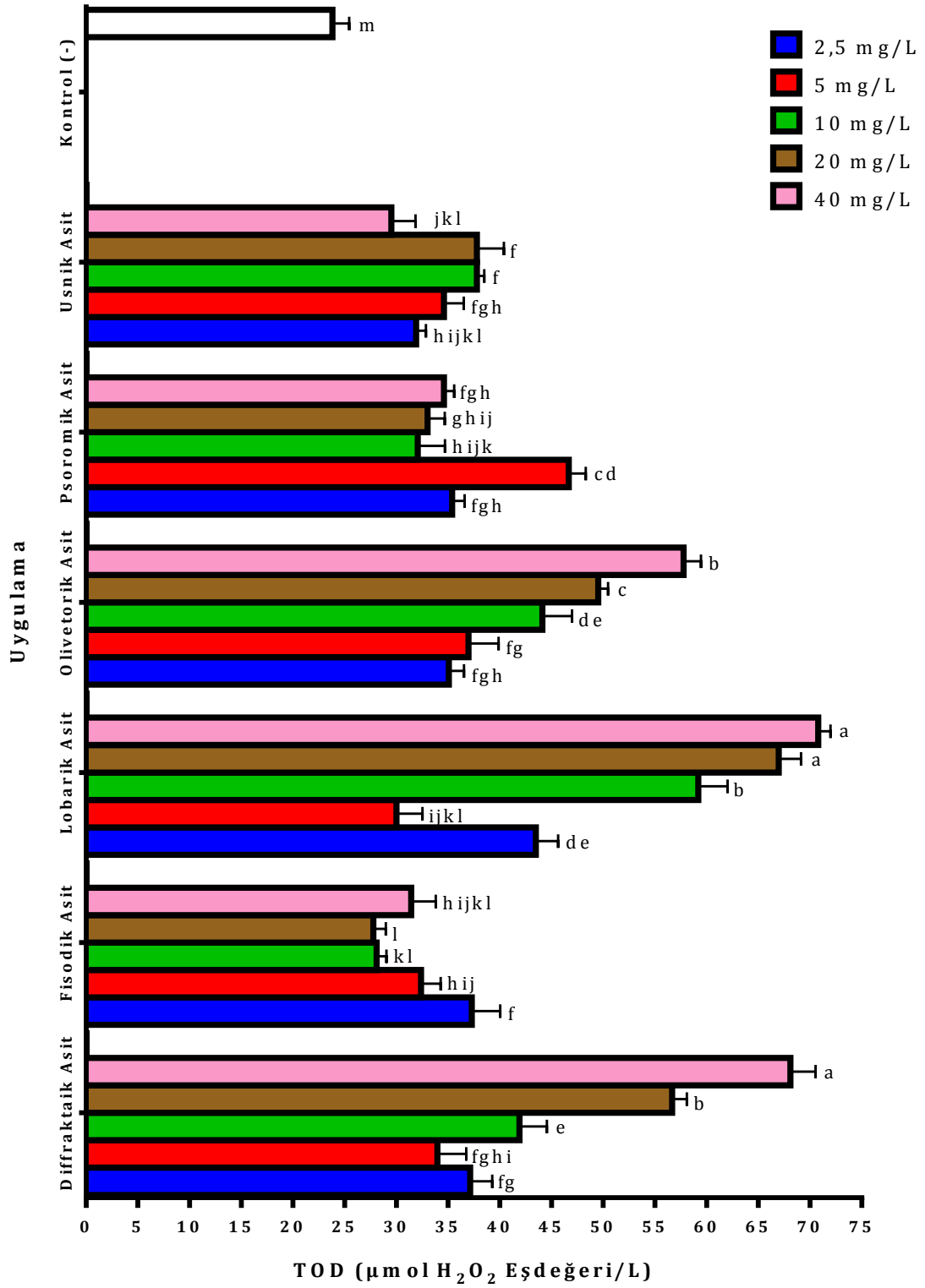
Metabolitlerin PSSK hücreleri üzerindeki TOD düzeylerine bakıldığında, PA hariç diğer metabolitlerin en yüksek konsantrasyona sahip çözeltilerinin en yüksek TOD düzeyine sahip oldukları tespit edilmiştir. Deneme grupları içerisinde en yüksek oranlar LA ve DA'nın 40 mg/L'lik konsantrasyonlu çözeltilerinde bulunmuştur (Sırasıyla 39,43 ve 34,87 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L). Diğer metabolitlerden OA, UA ve FA'nın 40 mg/L'lik konsantrasyonlu çözeltilerinin TOD düzeyleri ise sırasıyla 29,91, 27,80 ve 22,11 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L olarak rapor edilmiştir. PA'nın tüm konsantrasyonlarının düşük oranlarda oksidatif strese sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).

Test bileşiklerinin U87MG hücreleri üzerinde oksidatif stres meydana getirme etkileri incelendiğinde, LA, DA ve OA'nın 40 mg/L'lik konsantrasyonlarının sırasıyla 70,79, 68,09 ve 57,77 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L değerleri ile en yüksek oranda TOD kapasitesine sahip oldukları görülmüştür. Diğer üç metabolit kendi konsantrasyonları içerisinde kıyaslandığında, FA 2,5 mg/L'lik (37,30 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L), PA 5 mg/L'lik (46,66 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L) ve UA ise 20 mg/L'lik (37,78 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L) çözeltilerinde yüksek oranda TOD aktivitesi göstermiştir. U87MG hücreleri üzerinde oksidatif stres kapasiteleri test edilen liken metabolitlerinden FA'nın diğer metabolitlere kıyasla daha düşük oranda TOD aktivitesi gösterdiği ortaya çıkmıştır. (Şekil 4.8).

Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda, liken metabolitlerine maruz bırakılan PSSK ve U87MG hücrelerinin her ikisi üzerinde de kontrol gruplarına kıyasla metabolitlerde ortaya çıkan TOD düzeylerinin %95 güven aralığında anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.7 PSSK hücreleri üzerinde test edilen farklı liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu TOD düzeyleri (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)



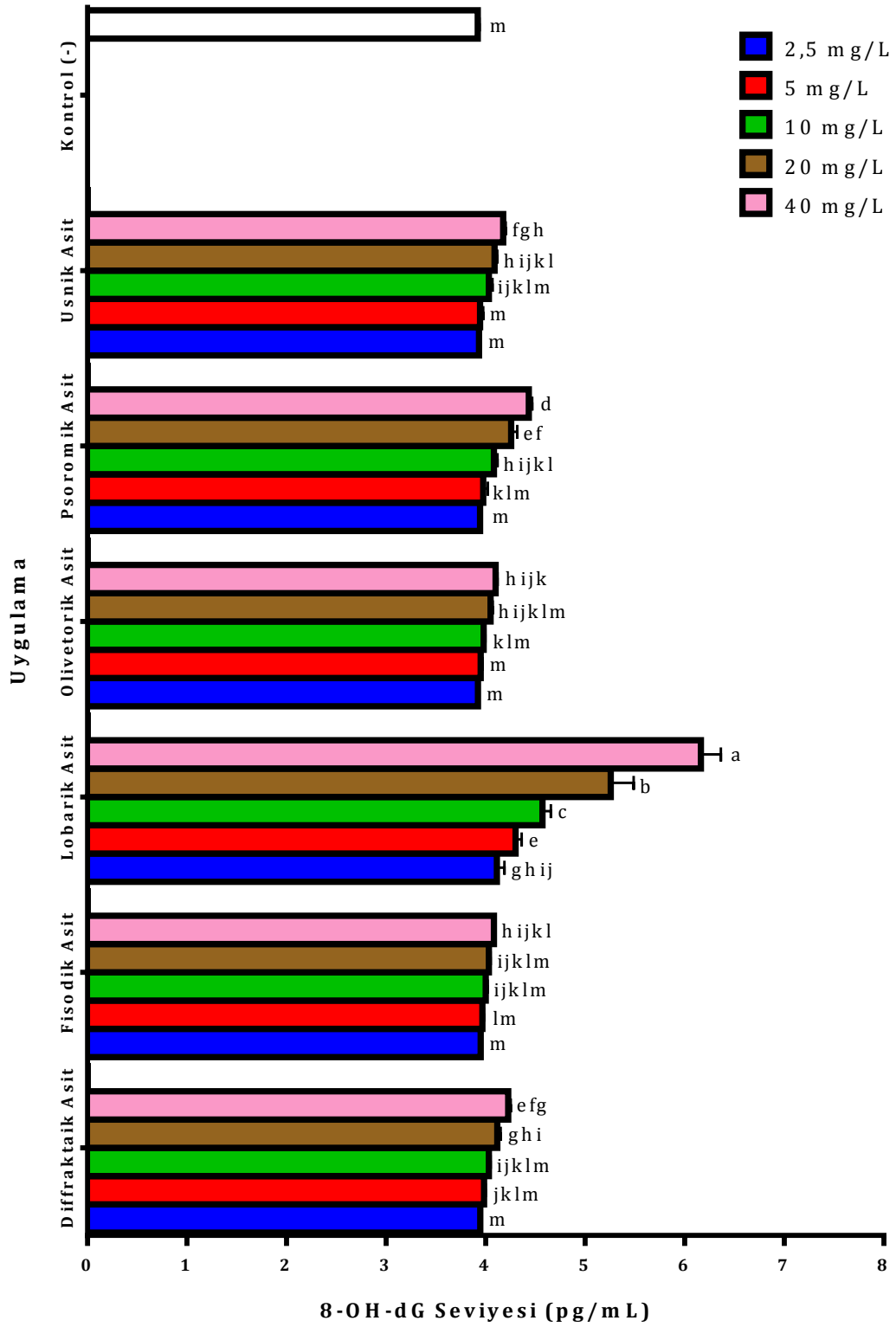
Şekil 4.8 U87MG hücreleri üzerinde test edilen farklı liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu TOD düzeyleri (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

4.3. Metabolitlerin Hücreler Üzerinde Sebep Oldukları Oksidatif DNA Hasar Düzeylerinin Belirlenmesi

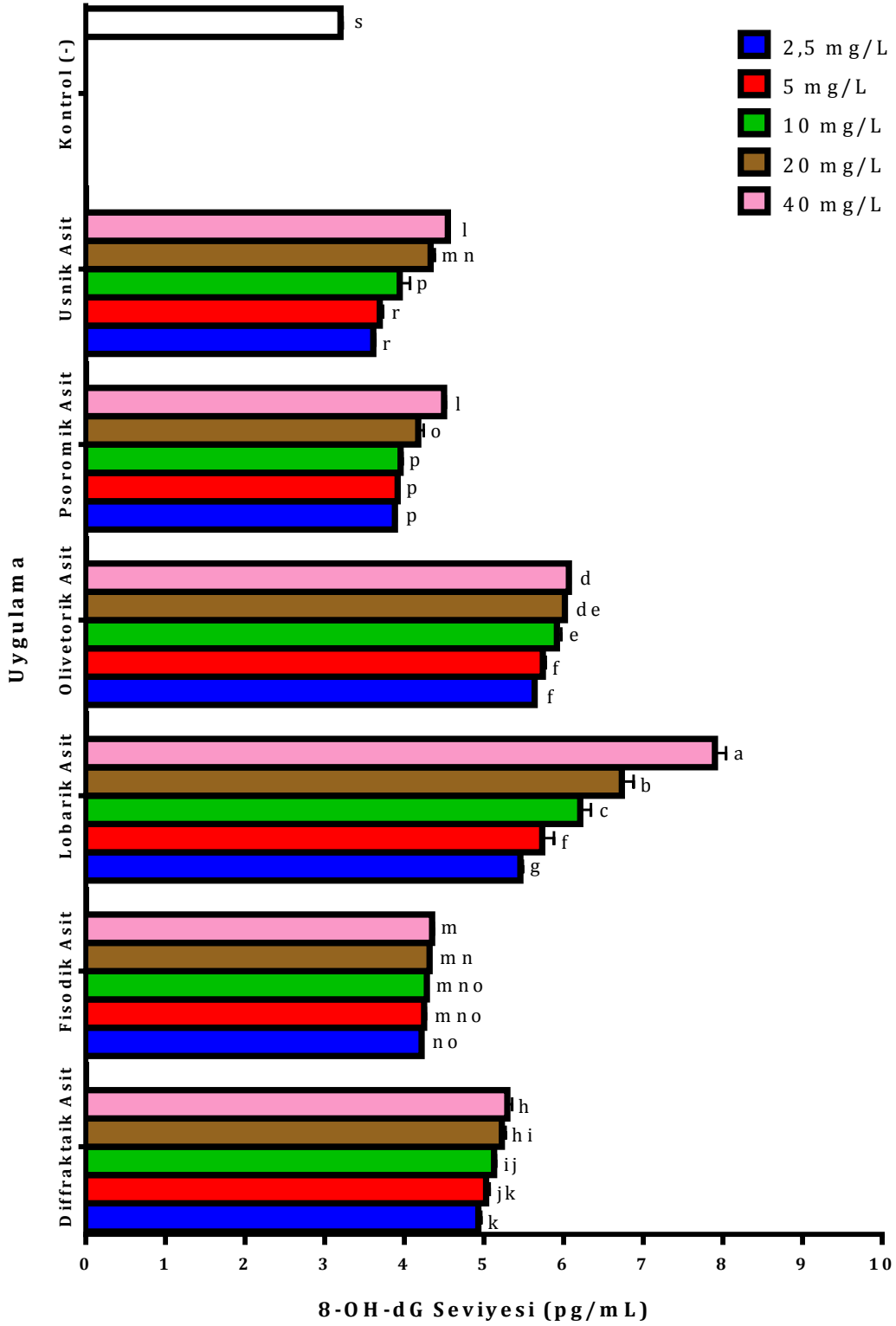
DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin farklı konsantrasyonlarının (2,5, 5, 10, 20 ve 40 mg/L) uygulamadan 48 saat sonra, PSSK (Şekil 4.9) ve U87MG (Şekil 4.10) hücreleri üzerindeki oksidatif DNA hasar düzeylerini belirlemek amacıyla hücrelerde ortaya çıkan 8-OH-dG seviyeleri belirlenmiştir.

Metabolitlerin PSSK hücreleri üzerindeki oksidatif DNA hasar etkileri incelendiğinde, LA metabolitinin 10, 20 ve 40 mg/L konsantrasyona sahip çözeltilerinin diğer tüm metabolit uygulamalarından farklı olarak yüksek derecede (Sırasıyla 4,57, 5,25 ve 6,16 pg/mL) DNA hasarı meydana getirdiği tespit edilmiştir. İstatistiki açıdan bakıldığında da bahsi geçen üç uygulamanın sahip olduğu değerlerin, diğer tüm uygulama değerlerinden $p < 0,05$ düzeyinde farklı olduğu göze çarpmaktadır. Kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında, DA ve UA'nın 20 ve 40 mg/L, FA ve OA'nın 40 mg/L, PA'nın 10, 20 ve 40 mg/L ve LA'nın ise tüm konsantrasyonlarının sebep oldukları 8-OH-dG seviyelerinin kontrol grubunun sebep olduğu 8-OH-dG seviyesinden istatistiksel olarak ($p < 0,05$) farklı ve daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9).

U87MG hücreleri üzerinde oksidatif DNA hasar etkileri test edilen liken metabolitlerinin hücrelerde ortaya çıkardığı 8-OH-dG miktarı incelendiğinde LA'nın 10, 20 ve 40 mg/L konsantrasyonlu çözeltilerinin meydana getirdiği sonuçlar (Sırasıyla 6,21, 6,73 ve 7,90 pg/mL) uygulamalar içerisindeki en yüksek oranları oluşturmuştur. Diğer taraftan OA metabolitinin de sebep olduğu oksidatif DNA hasar düzeyinin, diğer metabolitlerin sebep olduğu hasar düzeylerinden yüksek ve istatistiksel olarak ($p < 0,05$) farklı olduğu belirlenmiştir. UA metabolitinin 2,5, 5 ve 10 mg/L konsantrasyonlu çözeltilerinin sebep olduğu sırasıyla 3,61, 3,69 ve 3,94 pg/mL değerleri U87MG hücreleri üzerindeki en düşük 8-OH-dG seviyelerini meydana getirmiştir. Ayrıca liken metabolitleri ile U87MG hücreleri üzerinde gerçekleştirilen tüm uygulamalar sonucu ortaya çıkan değerler ile kontrol grubu değeri arasındaki farkın %95 güven aralığında anlamlı olduğu çalışma sonuçlarına yansımıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.9 Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen PSSK hücrelerinde gözlenen 8-OH-dG seviyesi (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)



Şekil 4.10 Farklı liken sekonder metabolitleri ile muamele edilen U87MG hücrelerinde gözlenen 8-OH-dG seviyesi (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.)

4.4. Hücreler Üzerinde Gerçekleştirilen Uygulamalar Sonucunda Değişkenler Arasındaki Korelasyon Seviyelerinin Belirlenmesi

DA, FA, LA, OA, PA ve UA metabolitlerinin farklı konsantrasyonlarının (2,5, 5, 10, 20 ve 40 mg/L) PSSK ve U87MG hücreleri üzerindeki farklı uygulamaları sonucunda ortaya çıkan değerler baz alınarak, denemedeki tüm değişkenlerin her birinin birbirleri ile arasında bir korelasyon olup olmadığını, eğer varsa bu korelasyonun hangi seviyede olduğunu tespit etmek amacıyla tüm değişkenler üzerinde ikili korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Test edilen her metabolit için ayrı ayrı uygulanan korelasyon analizinde değişken olarak hücre canlılığı, konsantrasyon, LDH aktivite, oksidatif DNA hasarı, TAK ve TOD göz önüne alınmıştır (Çizelge 4.3-4.14).

Gerçekleştirilen korelasyon analizleri incelendiğinde, tüm metabolit uygulamalarında *hücre canlılığı-konsantrasyon*, *hücre canlılığı-LDH aktivite* ve *hücre canlılığı-oksidatif DNA hasarı* ikili korelasyon analizlerinde değişkenler arasındaki Pearson korelasyon katsayısının $\leq -0,85$ olduğu ve bu nedenle ilgili değişkenler arasında yüksek derecede negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde tüm metabolit uygulamaları için gerçekleştirilen *konsantrasyon-LDH aktivite* ve *konsantrasyon-oksidatif DNA hasarı* ikili korelasyon analiz sonuçlarına göre Pearson korelasyon katsayısı $\geq 0,85$ olduğundan dolayı ilgili değişkenler arasında yüksek derecede pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir.

PSSK ve U87MG hücreleri üzerinde DA, LA ve OA uygulamaları sonucunda ortaya çıkan veriler *hücre canlılığı-TOD* değişkenleri arasında yüksek derecede negatif korelasyon olduğunu göstermiştir (Pearson korelasyon katsayısı $\leq -0,78$) (Çizelge 4.3, 4.4, 4.7-4.10). PSSK hücreleri üzerinde UA uygulaması sonucunda *hücre canlılığı-TOD* değişkenleri arasında -0,89 Pearson korelasyon katsayısı ile yüksek derecede negatif korelasyon tespit edilmişken, aynı metabolitin U87MG hücreleri üzerindeki uygulamasında istatistiki olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (Çizelge 4.13 ve 4.14).

Çizelge 4.3 PSSK hücreleri üzerinde DA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,95**	-0,91**	-0,93**	0,08	-0,88**
Konsantrasyon	-0,95**	1,00	0,96**	0,97**	-0,23	0,96**
LDH Aktivite	-0,91**	0,96**	1,00	0,97**	-0,15	0,91**
Oksidatif DNA Hasarı	-0,93**	0,97**	0,97**	1,00	-0,14	0,94**
TAK	0,08	-0,23	-0,15	-0,14	1,00	-0,26
TOD	-0,88**	0,96**	0,91**	0,94**	-0,26	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.4 U87MG hücreleri üzerinde DA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,99**	-0,96**	-0,89**	0,27	-0,95**
Konsantrasyon	-0,99**	1,00	0,96**	0,88**	-0,25	0,96**
LDH Aktivite	-0,96**	0,96**	1,00	0,94**	-0,11	0,93**
Oksidatif DNA Hasarı	-0,89**	0,88**	0,94**	1,00	-0,15	0,85**
TAK	0,27	-0,25	-0,11	-0,15	1,00	-0,34
TOD	-0,95**	0,96**	0,93**	0,85**	-0,34	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.5 PSSK hücreleri üzerinde FA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,97**	-0,98**	-0,96**	-0,90**	-0,40
Konsantrasyon	-0,97**	1,00	0,97**	0,95**	0,89**	0,50
LDH Aktivite	-0,98**	0,97**	1,00	0,98**	0,92**	0,32
Oksidatif DNA Hasarı	-0,96**	0,95**	0,98**	1,00	0,94**	0,28
TAK	-0,90**	0,89**	0,92**	0,94**	1,00	0,22
TOD	-0,40	0,50	0,32	0,28	0,22	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.6 U87MG hücreleri üzerinde FA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,97**	-0,97**	-0,93**	0,38	0,42
Konsantrasyon	-0,97**	1,00	0,95**	0,89**	-0,42	-0,32
LDH Aktivite	-0,97**	0,95**	1,00	0,97**	-0,28	-0,55*
Oksidatif DNA Hasarı	-0,93**	0,89**	0,97**	1,00	-0,18	-0,56*
TAK	0,38	-0,42	-0,28	-0,18	1,00	-0,02
TOD	0,42	-0,32	-0,55*	-0,56*	-0,02	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

* Korelasyon $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.7 PSSK hücreleri üzerinde LA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,92 ^{**}	-0,94 ^{**}	-0,94 ^{**}	0,95 ^{**}	-0,91 ^{**}
Konsantrasyon	-0,92 ^{**}	1,00	0,97 ^{**}	0,98 ^{**}	-0,90 ^{**}	0,85 ^{**}
LDH Aktivite	-0,94 ^{**}	0,97 ^{**}	1,00	0,98 ^{**}	-0,94 ^{**}	0,81 ^{**}
Oksidatif DNA Hasarı	-0,94 ^{**}	0,98 ^{**}	0,98 ^{**}	1,00	-0,91 ^{**}	0,86 ^{**}
TAK	0,95 ^{**}	-0,90 ^{**}	-0,94 ^{**}	-0,91 ^{**}	1,00	-0,82 ^{**}
TOD	-0,91 ^{**}	0,85 ^{**}	0,81 ^{**}	0,86 ^{**}	-0,82 ^{**}	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

^{**} Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.8 U87MG hücreleri üzerinde LA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,90 ^{**}	-0,96 ^{**}	-0,93 ^{**}	0,79 ^{**}	-0,84 ^{**}
Konsantrasyon	-0,90 ^{**}	1,00	0,98 ^{**}	0,99 ^{**}	-0,79 ^{**}	0,79 ^{**}
LDH Aktivite	-0,96 ^{**}	0,98 ^{**}	1,00	0,99 ^{**}	-0,85 ^{**}	0,85 ^{**}
Oksidatif DNA Hasarı	-0,93 ^{**}	0,99 ^{**}	0,99 ^{**}	1,00	-0,82 ^{**}	0,82 ^{**}
TAK	0,79 ^{**}	-0,79 ^{**}	-0,85 ^{**}	-0,82 ^{**}	1,00	-0,88 ^{**}
TOD	-0,84 ^{**}	0,79 ^{**}	0,85 ^{**}	0,82 ^{**}	-0,88 ^{**}	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

^{**} Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.9 PSSK hücreleri üzerinde OA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,90**	-0,88**	-0,85**	0,37	-0,78**
Konsantrasyon	-0,90**	1,00	0,91**	0,95**	-0,70**	0,94**
LDH Aktivite	-0,88**	0,91**	1,00	0,97**	-0,51	0,85**
Oksidatif DNA Hasarı	-0,85**	0,95**	0,97**	1,00	-0,64*	0,92**
TAK	0,37	-0,70**	-0,51	-0,64*	1,00	-0,79**
TOD	-0,78**	0,94**	0,85**	0,92**	-0,79**	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

* Korelasyon $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.10 U87MG hücreleri üzerinde OA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,92**	-0,97**	-0,98**	0,48	-0,95**
Konsantrasyon	-0,92**	1,00	0,98**	0,85**	-0,59*	0,95**
LDH Aktivite	-0,97**	0,98**	1,00	0,93**	-0,54*	0,97**
Oksidatif DNA Hasarı	-0,98**	0,85**	0,93**	1,00	-0,45	0,93**
TAK	0,48	-0,59*	-0,54*	-0,45	1,00	-0,63*
TOD	-0,95**	0,95**	0,97**	0,93**	-0,63*	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

* Korelasyon $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.11 PSSK hücreleri üzerinde PA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,90**	-0,91**	-0,94**	-0,95**	-0,02
Konsantrasyon	-0,90**	1,00	0,99**	0,97**	0,94**	0,30
LDH Aktivite	-0,91**	0,99**	1,00	0,97**	0,95**	0,27
Oksidatif DNA Hasarı	-0,94**	0,97**	0,97**	1,00	0,97**	0,25
TAK	-0,95**	0,94**	0,95**	0,97**	1,00	0,20
TOD	-0,02	0,30	0,27	0,25	0,20	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.12 U87MG hücreleri üzerinde PA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,94**	-0,96**	-0,93**	-0,93**	0,30
Konsantrasyon	-0,94**	1,00	0,99**	0,99**	0,93**	-0,34
LDH Aktivite	-0,96**	0,99**	1,00	0,99**	0,95**	-0,35
Oksidatif DNA Hasarı	-0,93**	0,99**	0,99**	1,00	0,92**	-0,33
TAK	-0,93**	0,93**	0,95**	0,92**	1,00	-0,45
TOD	0,30	-0,34	-0,35	-0,33	-0,45	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.13 PSSK hücreleri üzerinde UA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,93**	-0,93**	-0,91**	-0,44	-0,89**
Konsantrasyon	-0,93**	1,00	0,87**	0,94**	0,23	0,95**
LDH Aktivite	-0,93**	0,87**	1,00	0,93**	0,62*	0,90**
Oksidatif DNA Hasarı	-0,91**	0,94**	0,93**	1,00	0,45	0,94**
TAK	-0,44	0,23	0,62*	0,45	1,00	0,29
TOD	-0,89**	0,95**	0,90**	0,94**	0,29	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

* Korelasyon $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.14 U87MG hücreleri üzerinde UA uygulaması sonucu değişkenler arasındaki korelasyon seviyesi

	Hücre Canlılığı	Konsantrasyon	LDH Aktivite	Oksidatif DNA Hasarı	TAK	TOD
Hücre Canlılığı	1,00 ^a	-0,89**	-0,89**	-0,91**	0,38	0,17
Konsantrasyon	-0,89**	1,00	0,90**	0,94**	-0,28	-0,37
LDH Aktivite	-0,89**	0,90**	1,00	0,98**	-0,25	0,04
Oksidatif DNA Hasarı	-0,91**	0,94**	0,98**	1,00	-0,25	-0,10
TAK	0,38	-0,28	-0,25	-0,25	1,00	0,08
TOD	0,17	-0,37	0,04	-0,10	0,08	1,00

^a Pearson korelasyon katsayısı

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glioblastoma, beyin tümörleri içerisinde çok fazla rastlanmasından ve tehlikeli malign seyir göstermesinden dolayı tedavi amaçlı üzerinde birçok denemeler gerçekleştirilen kanser çeşididir. Hastalığın tedavisine yönelik gerçekleştirilen cerrahi, radyotereapi veya kemoterapi yöntemlerine ilave olarak bitkisel ürün kaynaklı tedavi metotları da göz ardı edilemez bir gerçektir. Birçok araştırmacı glioblastoma tedavisi kapsamında bitkisel ürünleri kullanarak hastalığın seyri üzerinde olumlu katkılar sağlamayı hedeflemişlerdir (Cheng ve ark., 2006; Das ve ark., 2007; Kim ve ark., 2008; Deng ve ark., 2009; Hahm ve ark., 2010; Jung ve Ghil, 2010; Jeong ve ark., 2011; Wang ve ark., 2013; Markiewicz-Żukowska ve ark., 2013a, 2013b; Khan ve ark., 2014). Fakat edindiğimiz literatür bilgileri ışığında liken adını verdiğimiz simbiyotik birlikteliğin glioblastoma tedavisi üzerinde denenmeyen bitkisel bir ürün olduğu görülmektedir.

Liken ekstraktlarının ve metabolitlerinin şimdiye kadar birçok araştırma konularına malzeme olduğu ve olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada ise liken sekonder metabolitlerinden DA, FA, LA, OA, PA ve UA'nın glioblastoma hücre hattı olan U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve bu etkilerin oksidatif stres kaynaklı olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca hücre proliferasyonu inhibasyonunda, test edilen liken sekonder metabolitlerinin hücrelerde ortaya çıkardıkları LDH ve 8-OH-dG miktarının etkili olup olmadığı başka bir inceleme konusu olmuştur. Tez çalışmasının bir diğer ayağında ise PSSK hücreleri kullanılarak test edilen liken sekonder metabolitlerinin sağlıklı beyin nöron hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve aynı zamanda bu metabolitlerin farklı konsantrasyonlarına sahip çözeltilerinin TAK düzeyleri de test edilmek suretiyle sağlıklı hücreler üzerinde oksidatif stresi azaltacak antioksidan kapasiteye sahip uygun metabolit konsantrasyonları tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen ikili korelasyon analizleri, farklı liken sekonder metabolitlerinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilen PSSK ve U87MG hücrelerinde canlılık yüzdesinin tüm metabolit uygulamalarında konsantrasyon artışı ile orantılı bir şekilde azaldığını göstermiştir (bkz. Çizelge 4.3-4.14). Aynı zamanda hesaplanan IC₅₀ değerleri,

hücreler üzerinde proliferasyonu inhibe edici metabolit konsantrasyonları hakkında fikir vermiştir (bkz. Çizelge 4.1 ve 4.2).

DA metabolitinin, PSSK hücreleri üzerinde ortaya çıkan yüksek ve U87MG hücreleri üzerinde ortaya çıkan düşük IC₅₀ değerleri (Sırasıyla 122,26 ve 35,67 mg/L), bu metabolitin kanser hücreleri üzerinde daha toksik olduğunu ortaya çıkarmıştır ve bu sonuç ile DA'nın belli konsantrasyonda kullanılarak sağlıklı hücelere zarar vermeden kanserli hücreler üzerinde toksik etki gösterebileceği kanısına varılmıştır (bkz. Çizelge 4.1 ve 4.2). Düşük konsantrasyonlardaki DA uygulamalarının PSSK hücreleri üzerindeki LDH ve 8-OH-dG aktivitelerine bakıldığında ortaya çıkan değerlerin kontrol değerlerinden $p > 0,05$ düzeyinde farklı olmadığı belirlenmişken (bkz. Şekil 4.3 ve 4.9), U87MG hücreleri için gerçekleştirilen uygulamalarda 5 mg/L ve üzeri konsantrasyonların kontrol grubundan önemli derecede farklı olduğu tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.4 ve 4.10). DA'nın hücreler üzerinde oksidatif stres meydana getirme seviyesi incelendiğinde, her iki hücre türe için de 20 ve 40 mg/L konsantrasyonlu çözeltilerinin yüksek değerlere sahip olduğu saptanmıştır (bkz. Şekil 4.7 ve 4.8). Ayrıca korelasyon analizi *hücre canlılığı-TOD* değişkenleri arasında yüksek düzeyde negatif korelasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır (bkz. Çizelge 4.3 ve 4.4). DA bileşiğinin PSSK hücreleri üzerindeki 10 mg/L konsantrasyonlu çözeltilisinin antioksidan kapasitesinin yüksek oranda olduğu TAK sonuçlarına yansımıştır (bkz. Şekil 4.5). DA metaboliti için ortaya çıkan sonuçlar, DA'nın düşük konsantrasyonlarının U87MG hücrelerini tahrip etmek için yeterli olduğunu ve ayrıca PSSK hücreleri üzerinde bu düşük konsantrasyonların istatistiksel açıdan yüksek derecede olumsuz etki göstermediğini, hatta 10 mg/L konsantrasyonlu DA çözeltilisinin PSSK hücreleri üzerinde antioksidan etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Araştırmacılar tarafından DA sekonder metaboliti ile gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda DA'nın kullanılan konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik kapasitesinin bulunduğu veya antioksidan etkisinin yüksekliği tespit edilmiştir. Bayir ve ark. (2006), sıçanlar üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada DA'nın indometasin kaynaklı mide lezyonlarına karşı koruyucu etki gösterdiğini, bu etkinin ise sıçanların mide dokularındaki nötrofil infiltrasyonu üzerindeki inhibitör etkinin ve oksidatif stresin indirgenmesi ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. DA'nın mide koruyucu özellikte

olduğunu belirten bir diğer çalışma ise Sepulveda ve ark. (2013)'na aittir. DA'nın ağrı kesici ve ateş düşürücü etkileri de başka bir araştırma sonucudur (Okuyama ve ark., 1995). Odabasoglu ve ark. (2012), DA'nın pro-apoptotik bir etken madde olarak apoptozu ve antioksidan sistemi indüklediğini ortaya çıkarmışlardır. DA'nın kanserli hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da göze çarpmaktadır. Tez çalışması kapsamında DA'nın düşük konsantrasyonlarının PSSK hücreleri üzerindeki yüksek antioksidan kapasitesi sonuçlarına paralel olarak Karagoz ve ark. (2014) da gerçekleştirdikleri çalışmada DA'nın düşük dozlarının sağlıklı fare mide, karaciğer, böbrek, ince ve kalın bağırsak hücrelerine karşı koruyucu özellik gösterirken, Ehrlich asit tümörü hücrelerine karşı antitümoral aktivitesinin yüksek olduğunu saptamışlardır. DA metabolitinin melanom (Brandao ve ark., 2013), keratinosit (Kumar ve Müller, 1999), kanserli meme, kolon ve serviks hücreleri (Brisdelli ve ark., 2013) üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkileri de rapor edilen diğer çalışmalardır.

FA metabolitinin PSSK hücreleri üzerinde ortaya çıkan IC_{50} değeri 698,19 mg/L iken (bkz. Çizelge 4.1), U87MG hücreleri üzerinde ortaya çıkan IC_{50} değeri 410,72 mg/L olmuştur (bkz. Çizelge 4.2). FA metaboliti ile muamele edilen PSSK ve U87MG hücrelerinde düşük oranlarda LDH salınımı ve 8-OH-dG seviyesi görülmüştür. Fakat U87MG hücreleri için LDH aktivitesi uygulamalarında 40 mg/L konsantrasyonda, 8-OH-dG aktivitesi uygulamalarında ise tüm konsantrasyonlarda PSSK'ye kıyasla daha yüksek değerler elde edilmiştir (bkz. Şekil 4.3, 4.4, 4.9 ve 4.10). TOD seviyelerine bakıldığında PSSK hücreleri için 40 mg/L konsantrasyon çözeltilisinin, U87MG hücreleri için ise 2 mg/L konsantrasyon çözeltilisinin en yüksek TOD oranını verdiği tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.7 ve 4.8). FA'nın PSSK hücreleri üzerindeki TAK seviyesi tüm deneme grupları içerisindeki en yüksek değeri oluşturmuştur. 20 ve 40 mg/L'lik uygulama TAK seviyeleri açısından %95 güven aralığında farklılık göstermemiştir (bkz. Şekil 4.5). FA metaboliti için ortaya çıkan sonuçlar, bu metabolitin PSSK ve U87MG hücreleri üzerinde yüksek derecede toksisite göstermediğini, fakat kanserli hücreler üzerinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha yüksek oranda letal etki gösterdiklerini ortaya çıkarmıştır. FA metabolitinin PSSK hücreleri üzerindeki yüksek antioksidan kapasiteleri göz önüne alındığında belli konsantrasyonda kullanımının sağlıklı hücreler üzerinde oksidatif stresi azaltarak olumlu etki yapabileceği düşünülmektedir.

FA'nın antioksidan kapasiteye sahip olduğuna dair çalışmalar daha önceki yıllarda araştırmacılar tarafından da gerçekleştirilmiştir. FA metabolitinin DPPH ve süperoksit anyon yakalama ve indirgeme gücü aktivitelerinin incelenmesi sonucunda bu metabolitin yüksek seviyede antioksidan etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Kosanić ve Ranković, 2011; Kosanić ve ark., 2013; Ranković ve ark., 2014). Reaktif metabolit formasyonunun inhibe edilmesi suretiyle antimutajenik etki gösterdiği de rapor edilen FA'nın (Osawa ve ark., 1991), belli konsantrasyonlarda kullanılması durumunda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Gollapudi ve ark., 1994; Yılmaz ve ark., 2005; Kosanić ve Ranković, 2011; Kosanić ve ark., 2013; Ranković ve ark., 2014). Toksik etkisi mikroorganizmalar üzerinde test edilen FA liken sekonder metabolitinin, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen ve U87MG hücreleri üzerinde gösterdiği ortaya çıkarılan sitotoksik etkisi başka hücreler üzerinde de görülmüştür. İnsan melanom ve kanserli kolon hücreleri üzerindeki düşük IC₅₀ değerleri belirlenen FA metabolitinin (Kosanić ve ark., 2013; Ranković ve ark., 2014), ayrıca kanserli serviks hücreleri üzerindeki canlılık oranını düşüren (Stojanović ve ark., 2014) ve sıçan timosit hücreleri üzerinde proliferasyonu inhibe edici aktiviteleri de (Pavlovic ve ark., 2013) araştırmacılar tarafından belirlenmiştir.

LA, PSSK ve U87MG hücreleri üzerinde gösterdiği en düşük ve birbirine yakın IC₅₀ değerlerinden (Sırasıyla 9,08 ve 5,77 mg/L) dolayı iki hücre türü üzerinde de yüksek sitotoksik etki gösteren metabolit olmuştur (bkz. Çizelge 4.1 ve 4.2). LA'nın sitotoksik etkisinin her iki hücre üzerinde de oksidatif stres meydana getirme özelliğinden kaynaklandığı sonuçlara yansımıştır (bkz. Şekil 4.7 ve 4.8), (bkz. Çizelge 4.7 ve 4.8). Hücrelerde salınan LDH enzimi ve 8-OH-dG baz seviyesinin yüksekliği hücrelerin hasara uğrama şekli hakkında bilgilenmemizi sağlamıştır (bkz. Şekil 4.3, 4.4, 4.9 ve 4.10). LA'nın antioksidan kapasitesine bakıldığında, PSSK ve U87MG hücreleri üzerinde *konsantrasyon-TAK* değişkenleri arasında yüksek seviyede negatif korelasyon belirlenmiş (bkz. Çizelge 4.7 ve 4.8), istatistiki açıdan ($p > 0,05$) PSSK hücreleri için 10, 20 ve 40 mg/L konsantrasyonlu çözeltilerinin kontrol grubundan farklı bir TAK değeri ortaya çıkarmadığı tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.5). LA metaboliti için ortaya çıkan sonuçlar, bu metabolitin PSSK ve U87MG hücrelerinin her ikisi için de yüksek derecede toksik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Spesifik olarak yalnızca kanserli hücrelerin hedeflenerek, tümörlü bölgeye LA metabolitinin uygulanması suretiyle

gerçekleştirilecek metotlar sayesinde glioblastomanın tedavisi sürecinde olumlu sonuçlar alınabileceği umulmaktadır.

Geçmiş yıllarda LA'nın toksik etkisinden faydalanılarak gerçekleştirilen antibakteriyal ve hücre antiproliferatif çalışmaları dikkat çekmektedir. Ayrıca LA metabolitinin antioksidan özellik içerdiği de bazı çalışma sonuçlarına yansımıştır. Bhattarai ve ark. (2013), *Stereocaulon alpinum* likeninden elde ettikleri LA metabolitinin antioksidan ve antibakteriyal özellikler barındırdığını rapor etmişlerdir. LA'nın antioksidan özelliğe sahip olduğu ile ilgili bir başka çalışma Thadhani ve ark. (2011) tarafından süperoksit, nitrik oksit ve DPPH radikali yakalama aktiviteleri aracılığı ile test edilmiş ve LA'nın belli bir antioksidan kapasitesi olduğu tespit edilmiştir. LA'ya maruz bırakılan hücrelerin öldüğü veya çoğalmalarının inhibe edildiği çalışmalar kapsamında, insan trombosit hücreleri üzerinde gerçekleştirilen denemede LA'nın yüksek seviyede inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Bucar ve ark., 2004). Başka bir sitotoksikite denemesinde *Stereocaulon alpinum* Laur. likeninden izole edilen LA'nın eritrolösemi ve meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve yüksek derecede hücre ölümüne rastlanmıştır (Ögmundsdóttir ve ark., 1998). LA'nın antifungal (Thadhani ve ark., 2012) ve antimitotik (Morita ve ark., 2009) aktivitelerinin ortaya çıkarıldığı çalışmalar da LA'nın toksik özelliğinin bir kez daha ön plana çıkmasına sebep olmuştur.

OA, tez kapsamında test edilen liken sekonder metabolitleri içerisinde kanserli ve normal hücreler üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında yan etkisi düşük seviyede olan, kanserli hücreler üzerinde yüksek oranda sitotoksikite gösteren bileşik türü olmuştur. OA'nın PSSK hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 125,71 mg/L (bkz. Çizelge 4.1), U87MG hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri ise 17,55 mg/L (bkz. Çizelge 4.2) olarak tespit edilmiştir. OA'nın U87MG hücreleri üzerindeki maksimum konsantrasyonunun (40 mg/L) LDH aktivitesi, LA'nın maksimum konsantrasyonunun sahip olduğu LDH aktivitesinden sonra gelmektedir ve LA'nın 20 mg/L konsantrasyonlu çözeltisinin LDH aktivitesi ile arasında %95 güven aralığında önemli derecede bir fark olmadığı sonuçlara yansımıştır (bkz. Şekil 4.4). U87MG hücreleri üzerindeki OA uygulamaları için ortaya çıkan korelasyon analizi sonuçları, *hücre canlılığı-konsantrasyon*, *hücre canlılığı-LDH aktivite*, *hücre canlılığı-oksidatif DNA hasarı* ve *hücre canlılığı-TOD* ikili değişkenleri arasındaki Pearson korelasyon katsayısının $\leq -0,90$ olduğunu

göstermiş ve bu durum ilgili değişkenler arasında çok yüksek oranda negatif korelasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır (bkz. Çizelge 4.10). PSSK hücreleri baz alındığında da yine bahsi geçen değişkenler arasında bir negatif korelasyon olduğu, fakat korelasyon derecesinin düştüğü saptanmıştır (bkz. Çizelge 4.9). OA bileşiğinin hücreler üzerindeki antioksidan kapasitesi incelendiğinde, *TAK-konsantrasyon* değişkenleri arasındaki negatif korelasyonun PSSK hücreleri için $p < 0,01$ düzeyinde (bkz. Çizelge 4.9), U87MG hücreleri için ise $p < 0,05$ düzeyinde (bkz. Çizelge 4.10) anlamlı olduğu göze çarpmıştır. Bu sonuç, OA'nın konsantrasyonu ile PSSK hücreleri üzerindeki antioksidan kapasitesi arasında daha yüksek seviyede negatif bir korelasyon olduğunu gözler önüne sermiştir. Ayrıca OA metabolitinin yalnızca 40 mg/L konsantrasyonlu çözeltilisinin kontrol grubuna kıyasla PSSK hücreleri üzerinde oksidatif DNA hasarına sebep olduğu (bkz. Şekil 4.9), U87MG hücreleri üzerinde ise tüm konsantrasyonların az da olsa 8-OH-dG seviyesini yükselttiği (bkz. Şekil 4.10) analiz sonuçlarına yansımıştır. OA metaboliti için ortaya çıkan sonuçlar, OA'nın düşük konsantrasyonlarının U87MG hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirken, PSSK hücreleri üzerinde yüksek oranda hasara sebep olmadıklarını ortaya çıkarmıştır.

Geçmiş yıllarda OA metaboliti ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar sınırlıdır. Bu sınırlı çalışmalar içerisinde OA'nın antikanserojen, antimikrobiyal ve antioksidan kapasitelerinin varlığından bahsedilmiştir. Koparal ve ark. (2010), *Pseudevernia furfuracea* liken türünden izole ettikleri olivetorik asidin anti-anjiyogenik aktivitesini araştırmışlar ve sıçanlardaki adipoz doku endotelyum hücrelerinin, çoğalmasının *in vitro* şartlarda inhibe edildiğini ve damar gelişiminin engellendiği saptamışlardır. Ayrıca olivetorik asidin doza bağlı olarak F-aktin stres fiberler üzerinde depolimerizasyon etkisinin olduğunu da rapor etmişlerdir. Endotelyum hücrelerindeki azalmayı, olivetorik asidin aktin hücre iskeletinin yapısını bozmasıyla açıklamışlardır. Türk ve ark. (2006), OA'nın farklı bakteri türleri üzerindeki antibakteriyal etkisini incelemişler ve bu metabolitin bakteri gelişimini inhibe edici aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır. Mitrović ve ark. (2014) ise yine OA metabolitinin antibakteriyal etkisini saptamışlar ve ayrıca bu metabolitin toplam fenol ve flavonoid içeriklerinin ve DPPH yakalama aktivitesinin yüksekliğine dikkat çekerek antioksidan kapasitesinin varlığını da tespit etmişlerdir.

PA metabolitinin PSSK hücreleri üzerinde sahip olduğu 79,40 mg/L (bkz. Çizelge 4.1), U87MG hücreleri üzerinde sahip olduğu 56,22 mg/L IC₅₀ değerleri (bkz. Çizelge 4.2), her iki hücre türünün de PA metaboliti tarafından yakın seviyede sitotoksositeye maruz kaldığını göstermiştir. PA'nın 2,5 mg/L konsantrasyonlu çözeltisi hariç, PSSK ve U87MG hücreleri üzerindeki ekstrasellüler LDH aktiviteleri kontrol grubu aktivitesinden istatistiksel açıdan farklı ve yüksek bulunmuştur (bkz. Şekil 4.3 ve 4.4). Her iki hücre türü için gerçekleştirilen metabolit uygulamalarında *konsantrasyon-LDH aktivite* arasında çok yüksek seviyede pozitif korelasyon tespit edilmiştir (Pearson korelasyon katsayısı = 0,99). Yine PSSK ve U87MG hücrelerinin oksidatif DNA hasarı için ortaya çıkan korelasyon analizi verilerinde de LDH aktivitesine paralel sonuçlar gözlenmiştir. *Konsantrasyon-oksidatif DNA hasarı ve LDH aktivite-oksidatif DNA hasarı* ikili analizlerinde çok yüksek düzeyde pozitif korelasyona rastlanmıştır (Pearson korelasyon katsayısı $\geq 0,97$) (bkz. Çizelge 4.11 ve 4.12). Her iki hücre üzerindeki TOD analizi verilerinde dalgalanma görüldüğünden, TOD ile başka bir değişken arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Özellikle, PA'nın 5 mg/L konsantrasyonlu çözeltisinin kanserli hücreler üzerinde gösterdiği yüksek, normal hücreler üzerinde sebep olduğu düşük oksidatif stres ilgili konsantrasyonu önemli hale getirmiştir (bkz. Şekil 4.7 ve 4.8). PA'nın PSSK ve U87MG hücreleri üzerindeki antioksidan kapasiteleri incelendiğinde, PSSK hücrelerinde U87MG hücrelerine kıyasla çok daha yüksek miktarda TAK düzeyi tespit edilmiş (bkz. Şekil 4.5 ve 4.6) ve bu düzeyin konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği de sonuçlara yansımıştır (bkz. Çizelge 4.11 ve 4.12). PA metaboliti için elde edilen tüm veriler incelendiğinde, bu metabolitin antioksidan kapasitesi yüksek bir bileşik olduğu ve belli konsantrasyonlarda kullanıldığında kanserli beyin hücreleri üzerinde letal etki gösterirken, normal hücreler üzerinde oksidatif stres oluşturmayacak özellikler taşıdığı düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

PA metabolitinin sahip olduğu antioksidan kapasiteden dolayı koruyucu özellikte olduğu, bu özelliğinin yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında toksik etki gösterebildiği araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda görülmüştür. Behera ve ark. (2012), PA'nın 0,005-0,2 mg/mL arasında konsantrasyona sahip çözeltilerinin, konsantrasyon artışı ile orantılı bir şekilde serbest ve nitrik oksit radikallerini yakalama aktivitelerinin ve lipid peroksidasyon inhibisyon düzeyinin

yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bu sayede antioksidan kapasitesinin varlığı tespit edilen PA'nın kardiyovasküler koruyucu aktivitesi de aynı çalışmanın sonuçları içerisinde yer almıştır. PA bileşiğinin koruyucu özelliğine dair başka bir çalışma fareler aracılığı ile gerçekleştirilmiş ve bu metabolitin mide koruyucu etkisi belirlenmiştir (Sepulveda ve ark., 2013). PA'nın toksik konsantrasyonları üzerinde durulan çalışmalarda, PA'ya maruz bırakılan farklı bakteri türlerinde (Celenza ve ark., 2013; Mitrović ve ark., 2014), karaciğer parazitinde (Lauinger ve ark., 2013) ve bazı kanserli hücrelerde (Correcché ve ark., 2004; Brandao ve ark., 2013) gelişimin inhibe edildiği görülmüştür. Correcché ve ark. (2004), gerçekleştirdikleri çalışmada PA'nın hepatositler üzerinde önemli derecede apoptotik aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır.

UA metabolitinin PSSK hücreleri için ortaya çıkan IC₅₀ değeri (132,69 mg/L) ile U87MG hücreleri için hesaplanan IC₅₀ değeri (41,55 mg/L) arasındaki farkın yüksek olması glioblastoma tedavisinde bu metabolitin düşük konsantrasyonda kullanılmasının daha düşük seviyede yan etkiye sebep olunacağını göstermiştir. LDH aktivite deneyinin sonuçları da UA'nın kanserli hücreler üzerinde sebep oldukları LDH salınım miktarının normal hücrelere kıyasla daha fazla olduğunu (bkz. Şekil 4.3 ve 4.4) ve her iki hücre türü üzerinde de ekstrasellüler LDH aktivitesinin konsantrasyon artışı ile orantılı olduğunu ortaya çıkarmıştır (bkz. Çizelge 4.13 ve 4.14). UA bileşiğinin PSSK hücreleri üzerinde oksidatif DNA hasarı meydana getirip getirmediği incelendiğinde, 2,5, 5 ve 10 mg/L konsantrasyonlu çözeltilerinin sebep oldukları 8-OH-dG seviyesi ile kontrol grubu 8-OH-dG seviyesi arasında önemli derecede ($p > 0,05$) farklılık olmadığı saptanmıştır (bkz. Şekil 4.9). UA'nın PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu oksidatif stres ile konsantrasyon ve 8-OH-dG seviyesi arasında çok yüksek düzeyde pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir (Pearson korelasyon katsayısı = 0,94). PSSK hücreleri üzerindeki uygulamalarda *hücre canlılığı-konsantrasyon*, *hücre canlılığı-LDH aktivite*, *hücre canlılığı-oksidatif DNA hasarı* ve *hücre canlılığı-TOD* ikili değişkenleri arasında Pearson korelasyon katsayısı $\leq -0,89$ olarak hesaplanmış ve bundan dolayı ilgili değişkenler arasında yüksek oranda negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.13). U87MG hücreleri baz alındığında yine *hücre canlılığı-konsantrasyon*, *hücre canlılığı-LDH aktivite* ve *hücre canlılığı-oksidatif DNA hasarı* ikili değişkenleri arasında yüksek seviyede negatif korelasyon tespit edilmiş, fakat *hücre canlılığı-TOD* değişkenleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (bkz. Çizelge 4.14). Bunun

nedeni U87MG hücreleri üzerinde UA metabolitinin TOD seviyesi değerlerinin dalgalı olmasıdır. En yüksek TOD değeri 10 ve 20 mg/L konsantrasyonlu çözeltilerde tespit edilmiş, 40 mg/L konsantrasyonda düşüş gözlenmiştir (bkz. Şekil 4.8). UA'nın PSSK hücreleri üzerindeki TAK değerlerine bakıldığında, 10 mg/L konsantrasyonlu çözeltilere kadar seviyenin arttığı, daha sonra konsantrasyon arttıkça TAK düzeyinde azalmanın meydana geldiği belirlenmiştir (bkz. Şekil 4.5). TAK seviyesinde belli bir konsantrasyon düzeyine kadar artış olduğundan *TAK-LDH aktivite* arasında $p < 0,05$ düzeyinde orta seviyede pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.13). U87MG hücreleri üzerinde UA'nın TAK seviyesi en yüksek konsantrasyonu 2,5 mg/L olmuştur ve bu değer kanserli hücreler üzerinde gerçekleştirilen tüm uygulamaların TAK seviyelerinin en yüksekini oluşturmuştur (bkz. Şekil 4.6). UA metaboliti için elde edilen bulgular, bu metabolitten sağlıklı hücreler üzerindeki TAK düzeyi yüksek konsantrasyonları da göz önünde bulundurularak glioblastoma tedavi sürecinde yararlanılması sonucunda, sağlıklı hücrelerin minimum seviyede zarar göreceği ve kanserli hücrelerin toksik etkiye maruz kalarak sayılarının azalacağı fikrini ortaya çıkarmıştır.

Tez çalışması kapsamında uygulamalarda kullanılan bileşikler içerisinde geçmiş yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda araştırmacıların en fazla yararlandığı metabolit UA olmuştur. Test edilen diğer bileşikler de olduğu gibi UA'nın da toksik etkisinin ortaya çıktığı belli konsantrasyonlar mevcuttur. Araştırmacılar da gerçekleştirdikleri sitotoksikite uygulamalarında bu konsantrasyonları belirlemişler ve birçok hücre çeşidi üzerinde istedikleri sonuçları elde etmişlerdir. UA'nın melanom, kolon kanseri (Manojlović ve ark., 2012a), lösemi, serviks kanseri (Brandao ve ark., 2013; Schinkovitz ve ark., 2014), mide, prostat, akciğer kanseri (Nguyen ve ark., 2014), beyne metastaz yapmış prostat kanseri, meme kanseri (Bazin ve ark., 2008) hücreleri üzerinde antitümörjenik aktivite gösterdiği araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Bačkorová ve ark. (2012), UA'nın kolon ve yumurtalık kanseri hücreleri üzerinde apoptozu indükleyici aktivitesini ispatlayarak UA'nın kanserli hücreler üzerindeki bir diğer aktivitesini gözler önüne sermişlerdir. UA bileşiğinin bazı hücrelerde oksidatif strese neden olduğu ve bundan dolayı nekroz olayının gerçekleştiği fare hepatosit hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada görülmüştür (Han ve ark., 2004). UA ile gerçekleştirilen antibakteriyal (Mitrović ve ark., 2011; Manojlović ve ark., 2012a,

2012b; Pavithra ve ark., 2013; Sisodia ve ark., 2013) ve insektisit (Emsen ve ark., 2012a; Yildirim ve ark., 2012a, 2012b) çalışmaları da UA metabolitinin toksik etkisinin ispat edildiği diğer alanlardır. Mevcut tez çalışmasında antioksidan kapasitesinin varlığı da tespit edilen UA'nın, daha önceki çalışmalarda başka araştırmacılar tarafından da antioksidan aktivitesinin yüksekliği ortaya konmuştur (Toledo Marante ve ark., 2003; Atalay ve ark., 2011; Mitrović ve ark., 2011; Manojlović ve ark., 2012a, 2012b; Pavithra ve ark., 2013; Sisodia ve ark., 2013). Antioksidan kapasitesinin yanında, antimutajenik (He ve ark., 2010), ağrı kesici ve ateş düşürücü (Okuyama ve ark., 1995) ve akciğer iltihabına karşı koruyucu (Su ve ark., 2014), etkileri tespit edilen UA, belli dozlarda kullanıldığında insan sağlığı açısından önemli bir bileşik olduğunu göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında altı farklı liken sekonder metabolitinin (DA, FA, LA, OA, PA ve UA) sağlıklı (PSSK) ve kanserli (U87MG) beyin hücreleri üzerindeki sitotoksosite, antioksidan, pro-oksidan ve genotoksosite potansiyelleri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, tüm metabolitlerde konsantrasyona bağlı sitotoksosite ve genotoksosite artışını ortaya koyarken, düşük dozlarda antioksidan kapasitenin yüksekliği dikkat çekmiştir. Test edilen liken sekonder metabolitlerinin PSSK hücreleri üzerindeki etkileri de göz önüne alındığında, glioblastoma multiforme tedavisinde başta OA olmak üzere DA ve UA'dan yararlanılarak olumlu sonuçlar elde edilebileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, P.D., 2001. Regulation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein by Cyclin/Cdks. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1471(3), M123–M133.
- Agar, G., Gulluce, M., Aslan, A., Bozari, S., Karadayi, M. ve Orhan, F., 2010. Mutation Preventive and Antigenotoxic Potential of Methanol Extracts of Two Natural Lichen. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20), 2132–2137.
- Ahmad, R.A., Abdullah, S.H.A.S., Serati-Nouri, H., Majid, F.A.A., Sarmidi, M.R. ve Aziz, R.A., 2014. Antiproliferative Activity of Coumarin and Cinnamon Water Extracts on Human Ovarian Cancer Cells. *Latin American Journal of Pharmacy*, 33(6), 960–965.
- Alberti, W., 1997. Acute and Late Side Effects of Radiotherapy for Ocular Disease: An Overview. *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology*, 30, 281–286.
- Algier, L., 1998. Merkezi Sinir Sistemi Kanseri. *Hemşireler İçin Kanser El Kitabı*, Editör: Platin, N. Akşam Sanat Okulu Yayınevi, Ankara, s. 303–311.
- Alpsoy, L., Aslan, A., Kotan, E., Agar, G. ve Anar, M., 2011. Protective Role of Two Lichens in Human Lymphocytes *In Vitro*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(7), 1661–1666.
- Anonim, 2012. *Bitkisel Ürünler ve Sağlık: Bilimsel Çerçeve ve Etik Açısından Yaklaşım*. Türk Tabipleri Birliği Merkez Konseyi, 36 s, Ankara.
- Anonim, 2014a. *Türkiye Kanser İstatistikleri*. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı, 45 s, Ankara.
- Anonim, 2014b. *Glioblastoma and Malignant Astrocytoma*. American Brain Tumor Association, 18 p, Chicago.
- Anonim, 2014c. Onkogen. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Onkogen>, (Erişim Tarihi: 20.12.2014).
- Ari, F., Celikler, S., Oran, S., Balikci, N., Ozturk, S., Ozel, M.Z., Ozyurt, D. ve Ulukaya, E., 2014a. Genotoxic, Cytotoxic, and Apoptotic Effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on Breast Cancer Cells. *Environmental Toxicology*, 29(7), 804–813.
- Ari, F., Ulukaya, E., Oran, S., Celikler, S., Ozturk, S. ve Ozel, M.Z., 2014b. Promising Anticancer Activity of a Lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against Breast Cancer Cell Lines and Genotoxic Effect on Human Lymphocytes. *Cytotechnology*, DOI: 10.1007/s10616-014-9713-4.

- Arslan, C., Dizdar, O. ve Altundag, K., 2014. Chemotherapy and Biological Treatment Options in Breast Cancer Patients with Brain Metastasis: An Update. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 15(12), 1643–1658.
- Arsov, C., Jankowiak, F., Hiester, A., Rabenalt, R., Quentin, M., Schimmöller, L., Blondin, D., Antoch, G. ve Albers, P., 2014. Prognostic Value of a Cell-Cycle Progression Score in Men with Prostate Cancer Managed with Active Surveillance after MRI-Guided Prostate Biopsy-a Pilot Study. *Anticancer Research*, 34(5), 2459–2466.
- Asahina, Y. ve Shibata, S., 1971. *Chemistry of Lichen Substances*. Japan Society for the Promotion of Science, 240 p, Tokyo.
- Aslan, A., 1995. Erzurum-Kars-Artvin Arasında Yer Alan Bölge Likenleri Üzerine Taksonomik İncelemeler. *Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bursa.
- Aslan, A., Agar, G., Alpsoy, L., Kotan, E. ve Ceker, S., 2012. Protective Role of Methanol Extracts of Two Lichens on Oxidative and Genotoxic Damage Caused by AFB1 in Human Lymphocytes *In Vitro*. *Toxicology and Industrial Health*, 28(6), 505–512.
- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adıgüzel, A., Sahin, F. ve Özkan, H., 2006. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri*, and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology*, 44(4), 247–252.
- Atalay, F., Halici, M.B., Mavi, A., Cakir, A., Odabaşoğlu, F., Kazaz, C., Aslan, A. ve Küfrelioğlu, Ö.I., 2011. Antioxidant Phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. Lichen Species. *Turkish Journal of Chemistry*, 35, 647–661.
- Ayhan, B., 2008. *Sideritis libanotica linearis* Bitkisinin Sekonder Metabolitlerinin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.
- Bačkorová, M., Bačkor, M., Mikeš, J., Jendželovský, R. ve Fedoročko, P., 2011. Variable Responses of Different Human Cancer Cells to the Lichen Compounds Parietin, Atranorin, Usnic Acid and Gyrophoric Acid. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 37–44.
- Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J. ve Fedoročko, P., 2012. Lichen Secondary Metabolites Are Responsible for Induction of Apoptosis in HT-29 and A2780 Human Cancer Cell Lines. *Toxicology in Vitro*, 26(3), 462–468.

- Bayir, Y., Odabasoglu, F., Cakir, A., Aslan, A., Suleyman, H., Halici, M. ve Kazaz, C., 2006. The Inhibition of Gastric Mucosal Lesion, Oxidative Stress and Neutrophil-Infiltration in Rats by the Lichen Constituent DiffRACTAIC Acid. *Phytomedicine*, 13, 584–590.
- Bazin, M.A., Le Lamer, A.C., Delcros, J.G., Rouaud, I., Uriac, P., Boustie, J., Corbel, J.C. ve Tomasi, S., 2008. Synthesis and Cytotoxic Activities of Usnic Acid Derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(14), 6860–6866.
- Behera, B.C., Mahadik, N. ve Morey, M., 2012. Antioxidative and Cardiovascular-Protective Activities of Metabolite Usnic Acid and Psoromic Acid Produced by Lichen Species *Usnea complanata* under Submerged Fermentation. *Pharmaceutical Biology*, 50(8), 968–979.
- Berkarda, B., 1998. Giriş. *Medikal Onkoloji*, Editörler: Berkarda, B., Hatemi, H. Çevik Yayınevi, İstanbul, s. 10–13.
- Berridge, M. V, Herst, P.M. ve Tan, A.S., 2005. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127–152.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F. ve Boustie, J., 2003. Cytotoxic Activity of Some Lichen Extracts on Murine and Human Cancer Cell Lines. *Phytomedicine*, 10(6-7), 499–503.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Rouaud, I., Delcros, J.G. ve Boustie, J., 2004. Cytotoxic Activity of Compounds from the Lichen: *Cladonia convoluta*. *Planta Medica*, 70(9), 874–877.
- Bhattarai, H.D., Kim, T., Oh, H. ve Yim, J.H., 2013. A New Pseudodepsidone from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum* and Its Antioxidant, Antibacterial Activity. *The Journal of Antibiotics*, 66(9), 559–561.
- Bilge, N., 2008. *Kanserde Erken Tanı Hayat Kurtarır*. Say Yayınları, 120 s, İstanbul.
- Blakeley, J. ve Grossman, S.A., 2012. Chemotherapy with Cytotoxic and Cytostatic Agents in Brain Cancer. *Handbook of Clinical Neurology*, 104, 229–54.
- Bolsover, S.R., Hyams, J.S., Shephard, E.A., White, H.A. ve Wiedemann, C.G., 2004. *Cell Biology*. New Jersey, 401–418.
- Boogerd, W., Groenveld, F., Linn, S., Baars, J.W., Brandsma, D. ve van Tinteren, H., 2012. Chemotherapy as Primary Treatment for Brain Metastases from Breast Cancer: Analysis of 115 One-Year Survivors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(8), 1395–403.

- Boustie, J. ve Grube, M., 2005. Lichens-A Promising Source of Bioactive Secondary Metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273–287.
- Brandao, L.F.G., Alcantara, G.B., Matos, M.D.F.C., Bogo, D., Freitas, D.D.S., Oyama, N.M. ve Honda, N.K., 2013. Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(2), 176–83.
- Bremner, R. ve Zacksenhaus, E., 2010. Cyclins, Cdks, E2f, Skp2, and More at the First International RB Tumor Suppressor Meeting. *Cancer Research*, 70(15), 6114–6118.
- Brisdelli, F., Perilli, M., Sellitri, D., Piovano, M., Garbarino, J.A., Nicoletti, M., Bozzi, A., Amicosante, G. ve Celenza, G., 2013. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An *In Vitro* Study. *Phytotherapy Research*, 27(3), 431–437.
- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D. ve Sharnoff, S., 2001. About the Lichens. *Lichens of North America*, Yale University Press, New Haven & London, 3–113.
- Bruce, J.N. ve Kennedy, B., 2009. Glioblastoma Multiforme. *Emedicine*, 1–41.
- Bucar, F., Schneider, I., Ögmundsdóttir, H. ve Ingólfssdóttir, K., 2004. Anti-Proliferative Lichen Compounds with Inhibitory Activity on 12(S)-HETE Production in Human Platelets. *Phytomedicine*, 11, 602–606.
- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F. ve Verotta, L., 2009. Antiproliferative Effects on Tumour Cells and Promotion of Keratinocyte Wound Healing by Different Lichen Compounds. *Planta Medica*, 75(6), 607–613.
- Burstein, H.J., 2000. Side Effects of Chemotherapy: Case 1. Radiation Recall Dermatitis from Gemcitabine. *Journal of Clinical Oncology*, 18(3), 693–694.
- Campbell, N.A. ve Reece, J.B., 2005a. The Cell Cycle. *Biology*, Ed: Wilbur, B. Von Hoffmann Press, USA, 218–233.
- Campbell, N.A. ve Reece, J.B., 2005b. Nervous Systems. *Biology*, Ed: Wilbur, B. Von Hoffmann Press, USA, 1011–1041.
- Cansaran, D., Çetin, D., Halici, M.G. ve Atakol, O., 2006. Determination of Usnic Acid in Some *Rhizoplaca* Species from Middle Anatolia and Their Antimicrobial Activities. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 61(1-2), 47–51.

- Cantley, L. ve Carpenter, C.L., 2008. Cell Signaling. *Cancer*, Ed: DeVita, V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A. Lippicott-Williams&Wilkins, Philadelphia, 67–78.
- Celenza, G., Segatore, B., Setacci, D., Perilli, M., Brisdelli, F., Bellio, P., Piovano, M., Garbarino, J.A., Amicosante, G. ve Nicoletti, M., 2013. Antibacterial Activity of Selected Metabolites from Chilean Lichen Species against Methicillin-Resistant Staphylococci. *Natural Product Research*, 27(17), 1528–1531.
- Chan, H.K. ve Ismail, S., 2014. Side Effects of Chemotherapy among Cancer Patients in a Malaysian General Hospital: Experiences, Perceptions and Informational Needs from Clinical Pharmacists. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(13), 5305–5309.
- Cheng, B., Cao, S., Vasquez, V., Annamalai, T., Tamayo-Castillo, G., Clardy, J. ve Tse-Dinh, Y.C., 2013. Identification of Anziaic Acid, a Lichen Depside from *Hypotrachyna* sp., as a New Topoisomerase Poison Inhibitor. *Plos One*, 8(4), e60770.
- Cheng, G., Zhang, Y., Zhang, X., Tang, H.F., Cao, W.D., Gao, D.K. ve Wang, X.L., 2006. Tubeimoside V(1), a New Cyclic Bisdesmoside from Tubers of *Bolbostemma paniculatum*, Functions by Inducing Apoptosis in Human Glioblastoma U87MG Cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(17), 4575–4580.
- Clavagnier, I., 2014. Preventing the Side Effects of Chemotherapy. *Revue de L'infirmière*, 198, 49–50.
- Cohen, P., 2014. New Role for the Mitochondrial Peptide Humanin: Protective Agent against Chemotherapy-Induced Side Effects. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(3), dju006.
- Colak, S., Geyikoğlu, F., Aslan, A. ve Deniz, G.Y., 2014. Effects of Lichen Extracts on Haematological Parameters of Rats with Experimental Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Toxicology and Industrial Health*, 30(10), 878–887.
- Combs, S.E., Gutwein, S., Schulz-Ertner, D., Van Kampen, M., Thilmann, C., Edler, L., Wannenmacher, M.M. ve Debus, J., 2005. Temozolomide Combined with Irradiation as Postoperative Treatment of Primary Glioblastoma Multiforme. Phase I/II Study. *Strahlentherapie und Onkologie*, 181(6), 372–377.
- Correcché, E.R., Enriz, R.D., Piovano, M., Garbarino, J. ve Gómez-Lechón, M.J., 2004. Cytotoxic and Apoptotic Effects on Hepatocytes of Secondary Metabolites Obtained from Lichens. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 32(6), 605–615.

- Culberson, C.F., 1969. *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. The University of North Carolina Press, 628 p, USA.
- Çelikler Kasımoğulları, S., Oran, S., Ari, F., Ulukaya, E., Aztopal, N., Sarimahmut, M. ve Öztürk, Ş., 2014. Genotoxic, Cytotoxic, and Apoptotic Effects of Crude Extract of *Usnea filipendula* Stirt. *In Vitro. Turkish Journal of Biology*, 38(6), 940–947.
- Das, A., Banik, N.L. ve Ray, S.K., 2007. Garlic Compounds Generate Reactive Oxygen Species Leading to Activation of Stress Kinases and Cysteine Proteases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells. *Cancer*, 110(5), 1083–1095.
- Demirelli, F.H., 2005. Hedefe Yönelik Kanser Tedavisi ve Monoklonal Antikorlar. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 19, 123–125.
- Deng, J.Y., Chen, S.J., Jow, G.M., Hsueh, C.W. ve Jeng, C.J., 2009. Dehydroeburicoic Acid Induces Calcium- and Calpain-Dependent Necrosis in Human U87MG Glioblastomas. *Chemical Research in Toxicology*, 22(11), 1817–1826.
- Derman, U., 1998. Medikal Onkolojiye Giriş. *Medikal Onkoloji*, Editörler: Berkarda, B., Hatemi, H. Çevik Yayınevi, İstanbul, s. 14–38.
- Dhillon, J., Miller, V.A., Carter, J., Badiab, A., Tang, C.N., Huynh, A. ve Peethambaran, B., 2014. Apoptosis-Inducing Potential of *Myrothamnus flabellifolius*, an Edible Medicinal Plant, on Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 7(1), 28–32.
- Dieckmann, K., Widder, J. ve Pötter, R., 2002. Long-Term Side Effects of Radiotherapy in Survivors of Childhood Cancer. *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology*, 37, 57–68.
- Dilsizoglu, A., Kavuncuoglu, Z. ve Oba, D., 2004. Old and New Using Areas, the Lichens with Unknown Properties. *Tubitak Science Technical*, 439, 86–89.
- Dökmeci, İ., 2000. Antienfeksiyöz ve Kemoterapötik İlaçlar. *Farmakoloji*, Editörler: Karadağ, Ç.H., Tuncer, A. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd., Edirne, s. 439–450.
- Dülger, B., Gücin, F. ve Aslan, A., 1998. *Cetraria islandica* (L) Ach Likeninin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Turkish Journal of Biology*, 22, 111–118.
- Efdi, M., Itoh, T., Akao, Y., Nozawa, Y., Koketsu, M. ve Ishihara, H., 2007. The Isolation of Secondary Metabolites and *In Vitro* Potent Anti-Cancer Activity of Clerodermic Acid from *Enicosanthum membranifolium*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(11), 3667–3671.

- Efferth, T., Herrmann, F., Tahrani, A. ve Wink, M., 2011. Cytotoxic Activity of Secondary Metabolites Derived from *Artemisia annua* L. towards Cancer Cells in Comparison to Its Designated Active Constituent Artemisinin. *Phytomedicine*, 18(11), 959–969.
- Einarsdóttir, E., Groeneweg, J., Björnsdóttir, G.G., Harethardottir, G., Omarsdóttir, S., Ingólfssdóttir, K. ve Ogmundsdóttir, H.M., 2010. Cellular Mechanisms of the Anticancer Effects of the Lichen Compound Usnic Acid. *Planta Medica*, 76(10), 969–974.
- Emsen, B., Aslan, A., Yildirim, E. ve Ercisli, S., 2013. Toxicity Effects of Some Lichen Species Extracts against the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 23(2), 193–199.
- Emsen, B., Bulak, Y., Yildirim, E., Aslan, A. ve Ercisli, S., 2012a. Activities of Two Major Lichen Compounds, Diffractaic Acid and Usnic Acid against *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(1), 5–10.
- Emsen, B., Yildirim, E., Aslan, A., Anar, M. ve Ercisli, S., 2012b. Insecticidal Effect of the Extracts of *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd. and *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale Against Adults of the Grain Weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(2), 145–149.
- Er, S., 2010. *Camellia sinensis* (Çay) Ekstrelerinin *In Vitro* Antioksidan, Yara İyileştirici ve U2OS Osteosarkom Hücrelerinde Antikanser Aktivitelerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.
- Erdine, S., 1992. *Kanserde Ağrı Tedavisi ve Palyatif Bakım*. Algoloji Derneği, 68 s, İstanbul.
- Erel, O., 2004. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285.
- Erel, O., 2005. A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111.
- Evinç, A., Koşay, S., Soykan, N. ve Ülker, S., 1998. Kanser Kemoterapisi. *Farmakoloji*, Editör: Koşay, S. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s. 253–273.
- Fan, L., Ma, Y., Liu, Y., Zheng, D. ve Huang, G., 2014. Silymarin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *European Journal of Pharmacology*, 743, 79–88.

- Farrell, C.J. ve Plotkin, S.R., 2007. Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. *Neurologic Clinics*, 25(4), 925–946.
- Fearnhead, H.O., 2004. Getting Back on Track, or What to Do When Apoptosis Is derailed: Recoupling Oncogenes to the Apoptotic Machinery. *Cancer Biology and Therapy*, 3(1), 21–28.
- Foster, D.A., Yellen, P., Xu, L. ve Saqcena, M., 2010. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes and Cancer*, 1(11), 1124–1131.
- Fronza, R., Tramonti, M., Atchley, W.R. ve Nardini, C., 2012. Brain Cancer Prognosis: Independent Validation of a Clinical Bioinformatics Approach. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 2(1), 2.
- Gan, W., Nie, B., Shi, F., Xu, X.M., Qian, J.C., Takagi, Y., Hayakawa, H., Sekiguchi, M. ve Cai, J.P., 2012. Age-Dependent Increases in the Oxidative Damage of DNA, RNA, and Their Metabolites in Normal and Senescence-Accelerated Mice Analyzed by LC-MS/MS: Urinary 8-Oxoguanosine as a Novel Biomarker of Aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 1700–1707.
- Gauden, A.J., Hunn, A., Erasmus, A., Waites, P., Dubey, A. ve Gauden, S.J., 2009. Combined Modality Treatment of Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme in a Regional Neurosurgical Centre. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(9), 1174–1179.
- Geyikoglu, F., Turkez, H. ve Aslan, A., 2007. The Protective Roles of Some Lichen Species on Colloidal Bismuth Subcitrate Genotoxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 23(8), 487–492.
- Ghate, N.B., Chaudhuri, D., Sarkar, R., Sajem, A.L., Panja, S., Rout, J. ve Mandal, N., 2013. An Antioxidant Extract of Tropical Lichen, *Parmotrema reticulatum*, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Breast Carcinoma Cell Line MCF-7. *Plos One*, 8(12), e82293.
- Ghazanfari, T., Zamani Taghizadeh Rabe, S., Yaraee, R. ve Mahmoudi, M., 2012. Study on Anti-Cancer Effect of Plant Extract ACA-1 on Gastric Adenocarcinoma Cell Line. *Journal of Medicinal Plants*, 11(42), 154–162.
- Goldlust, S.A., Turner, G.M., Goren, J.F. ve Gruber, M.L., 2008. Glioblastoma Multiforme: Multidisciplinary Care and Advances in Therapy. *Hospital Physician*, 39, 9–22.

- Gollapudi, S.R., Telikepalli, H., Jampani, H.B., Mirhom, Y.W., Drake, S.D., Bhattiprolu, K.R., Velde, D. Vander ve Mitscher, L.A., 1994. Alectosarmentin, a New Antimicrobial Dibenzofuranoid Lactol from the Lichen, *Alectoria sarmentosa*. *Journal of Natural Products*, 57(7), 934–938.
- Gong, Z.Y., Kidoya, H., Mohri, T., Han, Y. ve Takakura, N., 2014. DNA Damage Enhanced by the Attenuation of SLD5 Delays Cell Cycle Restoration in Normal Cells but Not in Cancer Cells. *Plos One*, 9(10), e110483.
- Göbelez, M., 2001. *Kanserden Korunma ve Kurtulmada Tabii Olanaklar*. Arasta Kitapları, 64 s, Ankara.
- Grujičić, D., Stošić, I., Kosanić, M., Stanojković, T., Ranković, B. ve Milošević-Djordjević, O., 2014. Evaluation of *In Vitro* Antioxidant, Antimicrobial, Genotoxic and Anticancer Activities of Lichen *Cetraria islandica*. *Cytotechnology*, 66(5), 803–813.
- Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G. ve Sokmen, A., 2006. Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*, 13(7), 515–521.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Aslan, A., 2002. Determination of Antioxidant Activity of Lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 325–329.
- Habermehl, D., Haase, K., Rieken, S., Debus, J. ve Combs, S.E., 2011. Defining the Role of Palliative Radiotherapy in Bone Metastasis from Primary Liver Cancer: An Analysis of Survival and Treatment Efficacy. *Tumori*, 97(5), 609–613.
- Haddad, M.M., Xu, W., Schwahn, D.J., Liao, F. ve Medrano, E.E., 1999. Activation of a cAMP Pathway and Induction of Melanogenesis Correlate with Association of p16(INK4) and p27(KIP1) to CDKs, Loss of E2F-Binding Activity, and Premature Senescence of Human Melanocytes. *Experimental Cell Research*, 253(2), 561–572.
- Hahm, S.W., Park, J. ve Son, Y.S., 2010. *Opuntia humifusa* Partitioned Extracts Inhibit the Growth of U87MG Human Glioblastoma Cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 247–252.
- Halici, M., Odabasoglu, F., Suleyman, H., Cakir, A., Aslan, A. ve Bayir, Y., 2005. Effects of Water Extract of *Usnea longissima* on Antioxidant Enzyme Activity and Mucosal Damage Caused by Indomethacin in Rats. *Phytomedicine*, 12(9), 656–662.

- Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D. ve Kaplowitz, N., 2004. Usnic Acid-Induced Necrosis of Cultured Mouse Hepatocytes: Inhibition of Mitochondrial Function and Oxidative Stress. *Biochemical Pharmacology*, 67(3), 439–451.
- Haraldsdóttir, S., Guolaugsdóttir, E., Ingólfssdóttir, K. ve Ogmundsdóttir, H.M., 2004. Anti-Proliferative Effects of Lichen-Derived Lipoxygenase Inhibitors on Twelve Human Cancer Cell Lines of Different Tissue Origin *In Vitro*. *Planta Medica*, 70(11), 1098–1100.
- Harrison, M.K., Adon, A.M. ve Saavedra, H.I., 2011. The G1 Phase Cdks Regulate the Centrosome Cycle and Mediate Oncogene-Dependent Centrosome Amplification. *Cell Division*, 6, 2.
- Haslam, G., Wyatt, D. ve Kitos, P.A., 2000. Estimating the Number of Viable Animal Cells in Multi-Well Cultures Based on Their Lactate Dehydrogenase Activities. *Cytotechnology*, 32(1), 63–75.
- Hatipoğlu, A.A., 2007. Kanserde Erken Tanı ve Tarama Problemleri. *Türkiye’de Kanser Kontrolü*, Editör: Tuncer, A.M. Onur Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, s. 381–388.
- Hatzoglou, V., Patel, G. V, Morris, M.J., Curtis, K., Zhang, Z., Shi, W., Huse, J., Rosenblum, M., Holodny, A.I. ve Young, R.J., 2014. Brain Metastases from Prostate Cancer: An 11-Year Analysis in the MRI Era with Emphasis on Imaging Characteristics, Incidence, and Prognosis. *Journal of Neuroimaging*, 24(2), 161–166.
- He, X., Hu, Y., Winter, J. ve Young, G.P., 2010. Anti-Mutagenic Lichen Extract Has Double-Edged Effect on Azoxymethane-Induced Colorectal Oncogenesis in C57BL/6J Mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(1), 31–35.
- Ho, A., 2002. Regulation of G1 Cell-Cycle Progression by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(1), 47–52.
- Huneck, S., 1999. The Significance of Lichens and Their Metabolites. *Naturwissenschaften*, 86(12), 559–570.
- Inagaki, R., Ninomiya, M., Tanaka, K., Watanabe, K. ve Koketsu, M., 2013. Synthesis and Cytotoxicity on Human Leukemia Cells of Furonaphthoquinones Isolated from *Tabebuia* Plants. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(6), 670–673.
- Işık, M. ve Akçay, F., 2014. Kanser Tedavisinde Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp. *Türkiye Klinikleri Journal of Family Medicine Special Topics*, 5(2), 28–36.
- Janiak, M.K., 2014. Epidemiological Evidence of Childhood Leukaemia around Nuclear Power Plants. *Dose-Response*, 12(3), 349–364.

- Jeong, J.C., Kim, J.W., Kwon, C.H., Kim, T.H. ve Kim, Y.K., 2011. *Fructus ligustri lucidi* Extracts Induce Human Glioma Cell Death through Regulation of Akt/mTOR Pathway *In Vitro* and Reduce Glioma Tumor Growth in U87MG Xenograft. *Phytotherapy Research*, 25(3), 429–434.
- John, D., Duell, E. ve Granger, C., 2008. *Dünya Kanser Raporu 2008*. Naturaprint, 510 s, Lyon.
- Johnson, G.B. ve Raven, P.H., 2004a. Chromosomes and Cell Reproduction. *Biology*, Harcourt Education Company, USA, 118–126.
- Johnson, G.B. ve Raven, P.H., 2004b. Hormones and the Endocrine System. *Biology*, Harcourt Education Company, USA, 974.
- Johnson-Ajinwo, O.R., Richardson, A. ve Li, W.W., 2015. Cytotoxic Effects of Stem Bark Extracts and Pure Compounds from *Margaritaria discoidea* on Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Phytomedicine*, 22(1), 1–4.
- Jung, H.W. ve Ghil, S.H., 2010. A *Torilis japonica* Extract Exerts Anti-Proliferative Activities on the U87MG Human Glioblastoma Cell Line. *Molecular Medicine Reports*, 3(6), 1041–1045.
- Kanbur, A. ve Çapık, C., 2011. Servikal Kanserden Korunma, Erken Tanı-Tarama Yöntemleri ve Ebe/Hemşirenin Rolü. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Dergisi*, 61–72.
- Karabağ, H., Çakmak, E., Çelik, B., İplikçioğlu, A.C. ve Koçarlan, S., 2013. Postpartum Baş Ağrısının Nadir Bir Nedeni: Glioblastoma Multiforme. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 11, 37–40.
- Karaca, T.D., 2008. İnsan Meme Kanseri Hücre Kültüründe *Nerium oleander* Bitkisinden Elde Edilen Ekstraktların Antikanserojen Etkisinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya*.
- Karagoz, I., Ozaslan, M., Guler, I., Uyar, C., Yalim, T., Kazanci, U., Aslan, A. ve Cakir, A., 2014. *In Vivo* Antitumoral Effect of Diffractaic Acid from Lichen Metabolites on Swiss Albino Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma: An Experimental Study. *International Journal of Pharmacology*, 10(6), 307–314.
- Karagöz, A. ve Aslan, A., 2005. Antiviral and Cytotoxic Activity of Some Lichen Extracts. *Biologia*, 60(3), 281–286.
- Kav, S., Hanoğlu, Z. ve Algier, L., 2008. Türkiyede Kanserli Hastalarda Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi Yöntemlerinin Kullanımı: Literatür Taraması. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 18(1), 32–38.

- Kawai, K., 2002. Long-Term Side Effects of Chemotherapy for Testicular Cancer. *Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy*, 29(7), 1300–1305.
- Kayl, A.E. ve Meyers, C.A., 2006. Side-Effects of Chemotherapy and Quality of Life in Ovarian and Breast Cancer Patients. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18(1), 24–28.
- Kerbel, R.S. ve Ellis, L.M., 2008. Angiogenesis. *Cancer*, Ed: DeVita, V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A. Lippicott-Williams&Wilkins, Philadelphia, 103–116.
- Khan, R.S., Senthil, M., Rao, P.C., Basha, A., Alvala, M., Tummuri, D., Masubuti, H., Fujimoto, Y. ve Begum, A.S., 2014. Cytotoxic Constituents of *Abutilon indicum* Leaves against U87MG Human Glioblastoma Cells. *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2014.976643.
- Kim, B., Kang, S., Jeong, G., Park, S. Bin ve Kim, S.J., 2014. Identification and Comparison of Aberrant Key Regulatory Networks in Breast, Colon, Liver, Lung, and Stomach Cancers through Methylome Database Analysis. *Plos One*, 9(5), e97818.
- Kim, M.J., Kim, D.H., Na, H.K., Oh, T.Y., Shin, C.Y. ve Surh, Y.J., 2005. Eupatilin, a Pharmacologically Active Flavone Derived from *Artemisia* Plants, Induces Apoptosis in Human Gastric Cancer (AGS) Cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 24(4), 261–269.
- Kim, S.Y., Lee, E.J., Woo, M.S., Jung, J.S., Hyun, J.W., Min, S.W., Kim, D.H. ve Kim, H.S., 2008. Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression by an Isoflavone Metabolite, Irisolidone in U87MG Human Astrogloma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(2), 493–499.
- Kirmizigul, S., Koz, O. ve Boke, N., 2007. Constituents of Apolar Extracts Including Essential Fatty Acids of Some Turkish Lichens. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4), 462–464.
- Koparal, A.T., Ulus, G., Zeytinoğlu, M., Tay, T. ve Türk, A.O., 2010. Angiogenesis Inhibition by a Lichen Compound Olivetoric Acid. *Phytotherapy Research*, 24(5), 754–758.
- Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T. ve Ranković, B., 2013. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* Lichens and Their Major Metabolites as Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Agents. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 112–118.
- Kosanić, M. ve Ranković, B., 2011. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Some Lichens and Their Constituents. *Journal of Medicinal Food*, 14(12), 1624–1630.

- Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A. ve Manojlović, N., 2014. *Cladonia* Lichens and Their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Agents. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 518–525.
- Kotan, E., Alpsoy, L., Anar, M., Aslan, A. ve Agar, G., 2011. Protective Role of Methanol Extract of *Cetraria islandica* (L.) against Oxidative Stress and Genotoxic Effects of AFB1 in Human Lymphocytes *In Vitro*. *Toxicology and Industrial Health*, 27(7), 599–605.
- Kumar, J., Dhar, P., Tayade, A.B., Gupta, D., Chaurasia, O.P., Upreti, D.K., Arora, R. ve Srivastava, R.B., 2014. Antioxidant Capacities, Phenolic Profile and Cytotoxic Effects of Saxicolous Lichens from Trans-Himalayan Cold Desert of Ladakh. *Plos One*, 9(6), e98696.
- Kumar, K.C.S. ve Müller, K., 1999. Lichen Metabolites. 2. Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Gyrophoric, Usnic and Diffractaic Acid on Human Keratinocyte Growth. *Journal of Natural Products*, 62(6), 821–823.
- Kutluk, T. ve Kars, A., 1994. *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*. Başbakanlık Basımevi, 114 s, Ankara.
- Lange, C.A., 2012. Hormones and Cancer: A Bright Future. *Hormones and Cancer*, 3(1-2), 1–2.
- Lauinger, I.L., Vivas, L., Perozzo, R., Stairiker, C., Tarun, A., Zloh, M., Zhang, X., Xu, H., Tonge, P.J., Franzblau, S.G., Pham, D.H., Esguerra, C.V., Crawford, A.D., Maes, L. ve Tasdemir, D., 2013. Potential of Lichen Secondary Metabolites against *Plasmodium* Liver Stage Parasites with FAS-II as the Potential Target. *Journal of Natural Products*, 76, 1064–1070.
- Leandro, L.F., Munari, C.C., Sato, V.L.F.L., Alves, J.M., de Oliveira, P.F., Mastrocola, D.F.P., Martins, S.D.P.L., Moraes, T.D.S., de Oliveira, A.I., Tozatti, M.G., Cunha, W.R. ve Tavares, D.C., 2013. Assessment of the Genotoxicity and Antigenotoxicity of (+)-Usnic Acid in V79 Cells and Swiss Mice by the Micronucleus and Comet Assays. *Mutation Research*, 753(2), 101–106.
- Lee, L.H., Yang, H. ve Bigras, G., 2014. Current Breast Cancer Proliferative Markers Correlate Variably Based on Decoupled Duration of Cell Cycle Phases. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep05122.
- LeRoith, D., 2011. Hormones and Cancer: Breast and Prostate. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 13–16.

- Li, Q., Zhou, S., Jing, J., Yang, T., Duan, S., Wang, Z., Mei, Q. ve Liu, L., 2013. Oligosaccharide from Apple Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in HT29 Human Colon Cancer Cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 245–254.
- Li, Z., Jaboin, J., Dennis, P.A. ve Thiele, C.J., 2005. Genetic and Pharmacologic Identification of Akt as a Mediator of Brain-Derived Neurotrophic factor/TrkB Rescue of Neuroblastoma Cells from Chemotherapy-Induced Cell Death. *Cancer Research*, 65(6), 2070–2075.
- Lin, X., Cai, Y.J., Li, Z.X., Chen, Q., Liu, Z.L. ve Wang, R., 2003. Structure Determination, Apoptosis Induction, and Telomerase Inhibition of CFP-2, a Novel Lichenin from *Cladonia furcata*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1622(2), 99–108.
- Little, M.P., de Vathaire, F., Shamsaldin, A., Oberlin, O., Campbell, S., Grimaud, E., Chavaudra, J., Haylock, R.G. ve Muirhead, C.R., 1998. Risks of Brain Tumour Following Treatment for Cancer in Childhood: Modification by Genetic Factors, Radiotherapy and Chemotherapy. *International Journal of Cancer*, 78(3), 269–275.
- Liu, C.C., Lin, J.H., Hsu, T.W., Su, K., Li, A.F.Y., Hsu, H.S. ve Hung, S.C., 2015. IL-6 Enriched Lung Cancer Stem-like Cell Population by Inhibition of Cell Cycle Regulators via DNMT1 Upregulation. *International Journal of Cancer*, 136(3), 547–559.
- Liu, J.M., Pan, F., Li, L., Liu, Q.R., Chen, Y., Xiong, X.X., Cheng, K., Yu, S. Bin, Shi, Z., Yu, A.C.H. ve Chen, X.Q., 2013. Piperlongumine Selectively Kills Glioblastoma Multiforme Cells via Reactive Oxygen Species Accumulation Dependent JNK and p38 Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(1), 87–93.
- Liu, S., Premnath, P.N., Bolger, J.K., Perkins, T.L., Kirkland, L.O., Kontopidis ve G., McInnes, C., 2013. Optimization of Non-ATP Competitive CDK/Cyclin Groove Inhibitors through REPLACE-Mediated Fragment Assembly. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(4), 1573–1582.
- Loa, J., Chow, P. ve Zhang, K., 2009. Studies of Structure-Activity Relationship on Plant Polyphenol-Induced Suppression of Human Liver Cancer Cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(6), 1007–1016.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L. ve Darnell, J., 2008. Life Begins with Cells. *Molecular Cell Biology*, MCAT Practise Test, 1–27.

- Luwor, R.B., Stylli, S.S. ve Kaye, A.H., 2013. The Role of Stat3 in Glioblastoma Multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*, 20(7), 907–911.
- Mandel, N.M., 1998. Kanser Metastazı. *Medikal Onkoloji*, Editörler: Berkarda, B., Hatemi, H. Çevik Yayınevi, İstanbul, s. 83–88.
- Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P. ve Stanojković, T., 2012a. Chemical Composition of Three *Parmelia* Lichens and Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Some Their Major Metabolites. *Phytomedicine*, 19(13), 1166–1172.
- Manojlović, N., Vasiljevic, P.J., Maskovic, P.Z., Juskovic, M. ve Bogdanovic-Dusanovic, G., 2012b. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (Article ID 452431), DOI: 10.1155/2012/452431.
- Markiewicz-Żukowska, R., Borawska, M.H., Fiedorowicz, A., Naliwajko, S.K., Sawicka, D. ve Car, H., 2013a. Propolis Changes the Anticancer Activity of Temozolomide in U87MG Human Glioblastoma Cell Line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 50.
- Markiewicz-Żukowska, R., Naliwajko, S.K., Bartosiuk, E., Moskwa, J., Isidorov, V., Soroczyńska, J. ve Borawska, M.H., 2013b. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Beebread, and Its Influence on the Glioblastoma Cell Line (U87MG). *Journal of Apicultural Science*, 57(2), 147–157.
- Mavrogenis, A.F., Papagelopoulos, P.J., Romantini, M., Angelini, A. ve Ruggieri, P., 2010. Side Effects of Chemotherapy in Musculoskeletal Oncology. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 20(1), 1–12.
- Mayadağlı, A., Dağ, Z.Ö., Aksu, A., Bıçakçı, B.C. ve Ekici, K., 2013. İntramedüller Yerleşimli Glioblastom Olgusuna Yaklaşım: Bir Olgu Sunumu. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 29(1), 51–55.
- Mayer, M., O'Neill, M.A., Murray, K.E., Santos-Magalhaes, N.S., Carneiro-Leao, A.M.A., Thompson, A.M. ve Appleyard, V.C.L., 2005. Usnic Acid: A Non-Genotoxic Compound with Anti-Cancer Properties. *Anti-Cancer Drugs*, 16(8), 805–809.
- McKeon, C., 2012. Reducing the Side Effects of Chemotherapy. *Australian Nursing Journal*, 19(8), 41.

- Melo, M.G.D., dos Santos, J.P.A., Serafini, M.R., Caregnato, F.F., Pasquali, M.A.D.B., Rabelo, T.K., da Rocha, R.F., Quintans, L., Araújo, A.A.D.S., da Silva, F.A., Moreira, J.C.F. ve Gelain, D.P., 2011. Redox Properties and Cytoprotective Actions of Atranorin, a Lichen Secondary Metabolite. *Toxicology in Vitro*, 25(2), 462–468.
- Mendes, R.L., Nutting, C.M. ve Harrington, K.J., 2002. Managing Side Effects of Radiotherapy in Head and Neck Cancer. *Hospital Medicine*, 63(12), 712–717.
- Mitacek, E.J., Brunnemann, K.D., Suttajit, M., Caplan, L.S., Gagna, C.E., Bhothisuwan, K., Siriamornpun, S., Hummel, C.F., Ohshima, H., Roy, R. ve Martin, N., 2008. Geographic Distribution of Liver and Stomach Cancers in Thailand in Relation to Estimated Dietary Intake of Nitrate, Nitrite, and Nitrosodimethylamine. *Nutrition and Cancer*, 60(2), 196–203.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Radulović, N., Mladenović, M., Stanković, M., Topuzović, M., Radojević, I., Stefanović, O., Vasić, S. ve Čomić, L., 2014. *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* Lichens as Sources of Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Agents. *EXCLI Journal*, 13, 938–953.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Comić, L., Dačić, D., Curčić, M. ve Marković, S., 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), 5428–5448.
- Morita, H., Tsuchiya, T., Kishibe, K., Noya, S., Shiro, M. ve Hirasawa, Y., 2009. Antimitotic Activity of Lobaric Acid and a New Benzofuran, Sakisacaulon A from *Stereocaulon sasakii*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(13), 3679–3681.
- Moshtaghie, A.A., Ani, M. ve Soltani, M., 1995. High Molecular Weight Alkaline Phosphatase as a Tumor Marker for Liver Cancer; A Comparative Study with Bone and Intestine Cancers. *Clinical Chemistry and Enzymology Communications*, 7(1), 9–16.
- Muirhead, C.R., 2013. Childhood Leukaemia near Nuclear Power Plants. *British Journal of Cancer*, 109(11), 2763–2764.
- Munzi, S., Triggiani, D., Ceccarelli, D., Climati, E., Tiezzi, A., Pisani, T., Paoli, L. ve Loppi, S., 2013. Antiproliferative Activity of Three Lichen Species Belonging to the Genus *Peltigera*. *Plant Biosystems*, 148(1), 83–87.
- Naka, N. ve Kawahara, M., 2002. Side Effects of Radiotherapy in Lung Cancer and Their Treatment. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 60, 411–413.

- Nakata, S., Campos, B., Bageritz, J., Bermejo, J.L., Becker, N., Engel, F., Acker, T., Momma, S., Herold-Mende, C., Lichter, P., Radlwimmer, B. ve Goidts, V., 2013. LGR5 Is a Marker of Poor Prognosis in Glioblastoma and Is Required for Survival of Brain Cancer Stem-like Cells. *Brain Pathology*, 23(1), 60–72.
- Nash, T.H., 2008. *Lichen Biology*. Cambridge University Press, 486 p, New York.
- Nguyen, T.T., Yoon, S., Yang, Y., Lee, H. Bin, Oh, S., Jeong, M.H., Kim, J.J., Yee, S.T., Crişan, F., Moon, C., Lee, K.Y., Kim, K.K., Hur, J.S. ve 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.
- Nieder, C., Adam ve M., Grosu, A., 2006. Combined Modality Treatment of Glioblastoma Multiforme: The Role of Temozolomide. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 1(1), 43–51.
- Niu, Y., Wang, Z., Huang, H., Zhong, S., Cai, W., Xie, Y. ve Shi, G., 2014. Activated Pregnane X Receptor Inhibits Cervical Cancer Cell Proliferation and Tumorigenicity by Inducing G2/M Cell-Cycle Arrest. *Cancer Letters*, 347(1), 88–97.
- O’Neill, M.A., Mayer, M.M., Murray, K.E., Rolim-Santos, H.M.L., Santos-Magalhães, N.S., Thompson, A.M. ve Appleyard, V.C.L., 2010. Does Usnic Acid Affect Microtubules in Human Cancer Cells? *Brazilian Journal of Biology*, 70(3), 659–664.
- Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M. ve Kazaz, C., 2006. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Usnic Acid on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 59–65.
- Odabasoglu, F., Yildirim, O.S., Aygun, H., Halici, Z., Halici, M., Erdogan, F., Cadirci, E., Cakir, A., Okumus, Z., Aksakal, B., Aslan, A., Unal, D. ve Bayir, Y., 2012. Diffractaic Acid, a Novel Proapoptotic Agent, Induces with Olive Oil Both Apoptosis and Antioxidative Systems in Ti-Implanted Rabbits. *European Journal of Pharmacology*, 674(2-3), 171–178.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. ve Pagano, M., 1995. Human Cyclin E, a Nuclear Protein Essential for the G1-to-S Phase Transition. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), 2612–2624.
- Okuno, T., Honda, E., Arakawa, T., Ogino, H. ve Ueno, H., 2014. Glutathione-Dependent Cell Cycle G1 Arrest and Apoptosis Induction in Human Lung Cancer A549 Cells Caused by Methylseleninic Acid: Comparison with Sodium Selenite. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(11), 1831–1837.

- Okuyama, E., Umeyama, K., Yamazaki, M., Kinoshita, Y. ve Yamamoto, Y., 1995. Usnic Acid and Diffractaic Acid as Analgesic and Antipyretic Components of Usnea Diffracta. *Planta Medica*, 61(2), 113–115.
- Osawa, T., Kumon, H., Reece, C.A. ve Shibamoto, T., 1991. Inhibitory Effect of Lichen Constituents on Mutagenicity Induced by Heterocyclic Amines. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(1), 35–40.
- Overby, A., Zhao, C.M. ve Chen, D., 2014. Plant Phytochemicals: Potential Anticancer Agents against Gastric Cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 19, 6–10.
- Ögmundsdóttir, H.M., Zoëga, G.M., Gissurarson, S.R. ve Ingólfssdóttir, K., 1998. Anti-Proliferative Effects of Lichen-Derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase on Malignant Cell-Lines and Mitogen-Stimulated Lymphocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(1), 107–115.
- Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A.B., Taghidizaj, A.A., Derici, K., Yılmaz, E., Aras, S. ve Cansaran Duman, D., 2013. Liken Sekonder Bileşiklerinin Farklı İnsan Kansere Hücre Tipleri Üzerine Antikanserojenik Etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70(4), 215–226.
- Öztürk, A. ve Aslan, A., 1991. Likenlerin Ekonomik Özellikleri ve Kuzeydoğu Anadolu'dan Bazı Liken Türleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 27–42.
- Paleri, V., Mehanna, H. ve Wight, R.G., 2010. TNM Classification of Malignant Tumours 7th Edition: What's New for Head and Neck? *Clinical Otolaryngology*, 35(4), 270–272.
- Palmieri, D., Fitzgerald, D., Shreeve, S.M., Hua, E., Bronder, J.L., Weil, R.J., Davis, S., Stark, A.M., Merino, M.J., Kurek, R., Mehdorn, H.M., Davis, G., Steinberg, S.M., Meltzer, P.S., Aldape, K. ve Steeg, P.S., 2009. Analyses of Resected Human Brain Metastases of Breast Cancer Reveal the Association between up-Regulation of Hexokinase 2 and Poor Prognosis. *Molecular Cancer Research*, 7(9), 1438–45.
- Partridge, A.H., Burstein, H.J. ve Winer, E.P., 2001. Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women with Early-Stage Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (30), 135–142.
- Paudel, B., Bhattarai, H.D., Pandey, D.P., Hur, J.S., Hong, S.G., Kim, I. ve Yim, J.H., 2012. Antioxidant, Antibacterial Activity and Brine Shrimp Toxicity Test of Some Mountainous Lichens from Nepal. *Biological Research*, 45(4), 387–391.

- Pavithra, G.M., Vinayaka, K.S., Rakesh, K.N., Junaid, S., Dileep, N., Kekuda, P.T.R., Siddiqua, S. ve Naik, A.S., 2013. Antimicrobial and Antioxidant Activities of a Macrolichen *Usnea pictoides* G. Awasthi (Parmeliaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8), 154–160.
- Pavletich, N.P., 1999. Mechanisms of Cyclin-Dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks, Their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 287(5), 821–828.
- Pavlovic, V., Stojanovic, I., Jadranin, M., Vajs, V., Djordjević, I., Smelcerovic, A. ve Stojanovic, G., 2013. Effect of Four Lichen Acids Isolated from *Hypogymnia physodes* on Viability of Rat Thymocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 160–164.
- Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., Gulino, A. ve Levrero, M., 2003. Differential Regulation of E2F1 Apoptotic Target Genes in Response to DNA Damage. *Nature Cell Biology*, 5(6), 552–558.
- Pejin, B., Iodice, C., Bogdanović, G., Kojić, V. ve Tešević, V., 2013. Stictic Acid Inhibits Cell Growth of Human Colon Adenocarcinoma HT-29 Cells. *Arabian Journal of Chemistry*, DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.03.003.
- Peng, Z., Xu, S., Li, H., Sun, C., Fu, M. ve Gao, M., 2014. Advanced Gastric Cancer with Brain Metastasis Effectively Treated by Arterial Infusion Chemotherapy: A Case Report. *Oncology Letters*, 7(2), 449–451.
- Perrino, C., Schiattarella, G.G., Magliulo, F., Ilardi, F., Carotenuto, G., Gargiulo, G., Serino, F., Ferrone, M., Scudiero, F., Carbone, A., Trimarco, B. ve Esposito, G., 2014. Cardiac Side Effects of Chemotherapy: State of Art and Strategies for a Correct Management. *Current Vascular Pharmacology*, 12(1), 106–116.
- Perry, J.K., Liu, D.X., Wu, Z.S., Zhu, T. ve Lobie, P.E., 2013. Growth Hormone and Cancer: An Update on Progress. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 20(4), 307–313.
- Pettersson, A., Turesson, I., Persson, C. ve Johansson, B., 2014. Assessing Patients' Perceived Bother from the Gastrointestinal Side Effects of Radiotherapy for Localized Prostate Cancer: Initial Questionnaire Development and Validation. *Acta Oncologica*, 53(3), 368–377.
- Polikandrioti, M., Gerasimou, E., Kotronoulas, G., Tsami, A., Evagelou, E. ve Kyritsi, H., 2010. Evaluation of the Side-Effects of Chemotherapy in Patients with Cancer. *Nosileftiki*, 49(4), 377–386.

- Popanda, O., Tan, X.L., Ambrosone, C.B., Kropp, S., Helmbold, I., von Fournier, D., Haase, W., Sautter-Bihl, M.L., Wenz, F., Schmezer, P. ve Chang-Claude, J., 2006. Genetic Polymorphisms in the DNA Double-Strand Break Repair Genes XRCC3, XRCC2, and NBS1 Are Not Associated with Acute Side Effects of Radiotherapy in Breast Cancer Patients. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15(5), 1048–1050.
- Postelmans, L., Bozkurt, E., Verougstraete, C. ve Leys, A., 1999. Late Side-Effects of Radiotherapy for Subfoveal Choroidal Neovascularization. *Bulletin de La Société Belge D'ophtalmologie*, 271, 61–68.
- Postlethwait, J.H. ve Hopson, J.L., 2006a. Gene Expression. *Modern Biology*, Ed: Grayson, M. Harcourt Education Company, USA, 225–228.
- Postlethwait, J.H. ve Hopson, J.L., 2006b. Nervous System and Sense Organs. *Modern Biology*, Ed: Grayson, M. Harcourt Education Company, USA, 1005–1015.
- Postlethwait, J.H. ve Hopson, J.L., 2006c. Endocrine System. *Modern Biology*, Ed: Grayson, M. Harcourt Education Company, USA, 1031–1033.
- Potter, S.S., Valerius, M.T. ve Brunskill, W.E., 2002. Using Progenitor Cells and Gene Chips to Define Genetic Pathways. *Embryonic Stem Cells Methods and Protocols*, Ed: Turksen, K. Humana Press, New Jersey, 269–271.
- Pucci, B. ve Giordano, A., 1999. Cell Cycle and Cancer. *Clinica Terapeutica*, 150(2), 135–141.
- Purvis, O.W., Coppins, B.J., Hawksworth, D.L., James, P.W. ve Moore, D.M., 1992. *The Lichen Flora of Great Britain and Ireland*. Natural History Museum Publications in Association with the British Lichen Society, 710 p, London.
- Rahman, H.A. ve Sedky, M., 2010. Pediatric Cancer. *Cancer Report 2010*, Ed: Tuncer, M. MN Medical & Nobel Publishing Company, Ankara, 274–278.
- Rahman, M.A., Yang, H., Kim, N.H. ve Huh, S.O., 2014. Induction of Apoptosis by *Dioscorea nipponica* Makino Extracts in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells via Mitochondria-Mediated Pathway. *Animal Cells and Systems*, 18(1), 41–51.
- Ranković, B., Kosanić, M., Manojlović, N., Rancić, A. ve Stanojković, T., 2014. Chemical Composition of *Hypogymnia physodes* Lichen and Biological Activities of Some Its Major Metabolites. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 408–416.

- Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Vasiljević, P. ve Manojlović, N., 2012. Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14707–14722.
- Ranković, B.R., Kosanić, M.M. ve Stanojković, T.P., 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activity of the Lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 97.
- Ranneh, Y. ve Ali, F., 2012. The Role of Some Plants on Colon Cancer: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(9), 798–805.
- Russo, A., Cardile, V., Piovano, M., Caggia, S., Espinoza, C.L. ve Garbarino, J.A., 2010. Pro-Apoptotic Activity of Ergosterol Peroxide and (22E)-Ergosta-7,22-Dien-5 α -Hydroxy-3,6-Dione in Human Prostate Cancer Cells. *Chemico-Biological Interactions*, 184(3), 352–358.
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Garbarino, J. ve Cardile, V., 2008. Lichen Metabolites Prevent UV Light and Nitric Oxide-Mediated Plasmid DNA Damage and Induce Apoptosis in Human Melanoma Cells. *Life Sciences*, 83(13-14), 468–74.
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Vanella, L., Cardile, V. ve Garbarino, J., 2006. Pannarin Inhibits Cell Growth and Induces Cell Death in Human Prostate Carcinoma DU-145 Cells. *Anti-Cancer Drugs*, 17(10), 1163–1169.
- Russo, J. ve Russo, I.H., 2008. Innovative Endocrinology of Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 630, 52–56.
- Ryu, J.S., Lee, J.T., Lim, M.U., Hwang, M.R., Hwang, K.A., Cho, Y.H., Lee, J.H., Ko, K. ve Choo, Y.K., 2013. Plant-Derived mAbs Have Effective Anti-Cancer Activities by Increasing Ganglioside Expression in Colon Cancers. *Biotechnology Letters*, 35(12), 2031–2038.
- Sánchez, R., González, L., Betancourt, L., Rodríguez, J.J., Sánchez, A., Spinetti, D., Parada, D. ve Melone, S., 2009. Isolated Tumor Cells in Bone Marrow and Its Relation with Known Prognostic Factors in Breast Cancer Patients. *The Breast Journal*, 15(2), 212–213.
- Schinkovitz, A., Kaur, A., Urban, E., Zehl, M., Páchniková, G., Wang, Y., Kretschmer, N., Slaninová, I., Pauli, G.F., Franzblau, S.G., Krupitza, G., Bauer, R. ve Kopp, B., 2014. Cytotoxic Constituents from *Lobaria scrobiculata* and a Comparison of Two Bioassays for Their Evaluation. *Journal of Natural Products*, 77(4), 1069–1073.

- Schwaller, J., Pabst, T., Koeffler, H.P., Niklaus, G., Loetscher, P., Fey, M.F. ve Tobler, A., 1997. Expression and Regulation of G1 Cell-Cycle Inhibitors (p16(INK4A), p15(INK4B), p18(INK4C), p19(INK4D) in Human Acute Myeloid Leukemia and Normal Myeloid Cells. *Leukemia*, 11(1), 54–63.
- Sepulveda, B., Chamy, M.C., Piovano, M. ve Areche, C., 2013. Lichens: Might Be Considered as a Source of Gastroprotective Molecules? *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(2), 1750–1752.
- Serdengeçti, S., 1998. Biolojik Tedavi. *Medikal Onkoloji*, Editörler: Berkarda, B., Hatemi, H. Çevik Yayınevi, İstanbul, s. 187–190.
- Shandiz, F.H., Salek, R., Amirabadi, A., Moazzen, N. ve Ersi, M.F., 2014. Assessment of the Relationship between Absorbed Skin Dose and Chronic Dermal Side-Effects of Radiotherapy in Patients with Breast Cancer. *Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 17(116), 1–7.
- Shen, T., Wan, W., Yuan, H., Kong, F., Guo, H., Fan, P. ve Lou, H., 2007. Secondary Metabolites from *Commiphora opobalsamum* and Their Antiproliferative Effect on Human Prostate Cancer Cells. *Phytochemistry*, 68(9), 1331–1337.
- Shrestha, G., El-Naggar, A.M., St Clair, L.L. ve O'Neill, K.L., 2014. Anticancer Activities of Selected Species of North American Lichen Extracts. *Phytotherapy Research*, DOI: 10.1002/ptr.5233.
- Singh, B.N., Singh, B.R., Jiang, S.W. ve Singh, H.B., 2011. Plant Polyphenols for Prevention and Therapy of Liver Cancer. *Liver Cancer: Causes, Diagnosis and Treatment*, Nova Science Publishers, 1–52.
- Singh, N., Nambiar, D., Kale, R.K. ve Singh, R.P., 2013. Usnic Acid Inhibits Growth and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma A549 Cells. *Nutrition and Cancer*, 65(1), 36–43.
- Sırma, E., 2013. Bitkisel Flavonoid Silimarin ve Fenolik Asit Stilbenoid Resveratrolün Karaciğer Kanseri Hücrelerindeki Antikanser Etkilerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze*.
- Sisodia, R., Geol, M., Verma, S., Rani, A. ve Dureja, P., 2013. Antibacterial and Antioxidant Activity of Lichen Species *Ramalina roesleri*. *Natural Product Research*, 27(23), 2235–2239.
- Smirniotopoulos, J.G., Murphy, F.M., Rushing, E.J., Rees, J.H. ve Schroeder, J.W., 2007. Patterns of Contrast Enhancement in the Brain and Meninges. *Radiographics*, 27(2), 525–551.

- Smith, M.R., Matthews, N.T., Jones, K.A. ve Kung, H.F., 1993. Biological Actions of Oncogenes. *Pharmacology and Therapeutics*, 58(2), 211–236.
- Sobin, L.H. ve Fleming, I.D., 1997. TNM Classification of Malignant Tumors, Fifth Edition (1997). *Cancer*, 80(9), 1803–1804.
- Solmaz, S., Adan Gokbulut, A., Cincin, B., Ozdogu, H., Boga, C., Cakmakoglu, B., Kozanoglu, I. ve Baran, Y., 2014. Therapeutic Potential of Apigenin, a Plant Flavonoid, for Imatinib-Sensitive and Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Nutrition and Cancer*, 66(4), 599–612.
- Song, Y., Samulski, T.D. ve Van Dyke, T.A., 2008. *Cancer*. Ed: DeVita, V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A. Lippicott-Williams&Wilkins, Philadelphia, 3–12.
- Stagos, D., Amoutzias, G.D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A.M. ve Kouretas, D., 2012. Chemoprevention of Liver Cancer by Plant Polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 2155–2170.
- Stansfield, W.D., Colome, J.S. ve Cano, R.J., 2003. *Molecular and Cell Biology, Crash Course*. Ed: Cullen, K.E. McGraw-Hill Companies, USA, 1–17.
- Stewart, P., Boonsiri, P., Puthong, S. ve Rojpiulstitt, P., 2013. Antioxidant Activity and Ultrastructural Changes in Gastric Cancer Cell Lines Induced by Northeastern Thai Edible Folk Plant Extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 60.
- Stoehlmacher, J., 2007. Prediction of Efficacy and Side Effects of Chemotherapy in Colorectal Cancer. *Recent Results in Cancer Research*, 176, 81–88.
- Stojanović, I.Ž., Najman, S., Jovanović, O., Petrović, G., Najdanović, J., Vasiljević, P. ve Šmelcerović, A., 2014. Effects of Depsidones from *Hypogymnia physodes* on HeLa Cell Viability and Growth. *Folia Biologica*, 60(2), 89–94.
- Su, Z.Q., Mo, Z.Z., Liao, J. Bin, Feng, X.X., Liang, Y.Z., Zhang, X., Liu, Y.H., Chen, X.Y., Chen, Z.W., Su, Z.R. ve Lai, X.P., 2014. Usnic Acid Protects LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice through Attenuating Inflammatory Responses and Oxidative Stress. *International Immunopharmacology*, 22(2), 371–378.
- Süleyman, H., Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Karagoz, Y., Gocer, F., Halici, M. ve Bayir, Y., 2003. Anti-Inflammatory and Antiulcerogenic Effects of the Aqueous Extract of *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.. *Phytomedicine*, 10(6-7), 552–557.

- Süleyman, H., Yildirim, D., Aslan, A., Göçer, F., Gepdiremen, A. ve Güvenalp, Z., 2002. An Investigation of the Antiinflammatory Effects of an Extract from *Cladonia rangiformis* Hoffm.. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(1), 10–13.
- Şakalar, Ç., İzgi, K. ve Canatan, H., 2013. Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 27(2), 105–110.
- Tan, X.L., Popanda, O., Ambrosone, C.B., Kropp, S., Helmbold, I., von Fournier, D., Haase, W., Sautter-Bihl, M.L., Wenz, F., Schmezer, P. ve Chang-Claude, J., 2006. Association between TP53 and p21 Genetic Polymorphisms and Acute Side Effects of Radiotherapy in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 97(3), 255–262.
- Taylor, T.N., Hass, H., Remy, W. ve Kerp, H., 1995. The Oldest Fossil Lichen. *Nature*, 378(6554), 244.
- Thadhani, V.M., Choudhary, M.I., Ali, S., Omar, I., Siddique, H. ve Karunaratne, V., 2011. Antioxidant Activity of Some Lichen Metabolites. *Natural Product Research*, 25(19), 1827–1837.
- Thadhani, V.M., Choudhary, M.I., Khan, S. ve Karunaratne, V., 2012. Antimicrobial and Toxicological Activities of Some Depsides and Depsidones. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 40(1), 43–48.
- Toledo Marante, F.J., García Castellano, A., Estévez Rosas, F., Quintana Aguiar, J. ve Bermejo Barrera, J., 2003. Identification and Quantitation of Allelochemicals from the Lichen *Lethariella canariensis*: Phytotoxicity and Antioxidative Activity. *Journal of Chemical Ecology*, 29(9), 2049–2071.
- Tomsuk, Ö., 2011. Kekik Yağı ve Bileşeni Olan Karvakrolün Antikanser Etkisinin HepG2 Hepatoselüler Karsinoma Hücrelerinde *In Vitro* Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.
- Turkez, H., Aydın, E. ve Aslan, A., 2012. *Xanthoria elegans* (Link) (lichen) Extract Counteracts DNA Damage and Oxidative Stress of Mitomycin C in Human Lymphocytes. *Cytotechnology*, 64(6), 679–686.
- Turkez, H., Geyikoglu, F., Aslan, A., Karagöz, Y., Turkez, O. ve Anar, M., 2010. Antimutagenic Effects of Lichen *Pseudovernia furfuracea* (L.) Zoph. Extracts against the Mutagenicity of Aflatoxin B1 *In Vitro*. *Toxicology and Industrial Health*, 26(9), 625–631.

- Türk, H., Yılmaz, M., Tay, T., Türk, A.O. ve Kivanç, M., 2006. Antimicrobial Activity of Extracts of Chemical Races of the Lichen *Pseudevernia furfuracea* and Their Physodic Acid, Chloroatranorin, Atranorin, and Olivetoric Acid Constituents. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 61(7-8), 499–507.
- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M. ve Sysa, P., 2014. Glioblastoma Multiforme - an Overview. *Contemporary Oncology*, 18(5), 307–312.
- Usta, S., 2008. *Kanser Tedavisinde 110 Yöntem*. Gelecek Atölyesi Yayıncılık ve Eğitim Hizmetleri, 223 s, İstanbul.
- Van, T.N.N., Pellerano, M., Lykaso, S. ve Morris, M.C., 2014. Fluorescent Protein Biosensor for Probing CDK/Cyclin Activity *In Vitro* and in Living Cells. *Chembiochem*, 15(15), 2298–2305.
- Vartia, K.O., 1973. Antibiotics in Lichens. *The Lichens*, Ed: Ahmadjian, V., Hale, M.E. Academic Press, New York, 547.
- Verrone, J.R., Alves, F. de A., Prado, J.D., Boccaletti, K.W., Sereno, M.P., Silva, M.L.G. ve Jaguar, G.C., 2013. Impact of Intraoral Stent on the Side Effects of Radiotherapy for Oral Cancer. *Head and Neck*, 35(7), E213–E217.
- Waiyaput, W., Payungporn, S., Issara-Amphorn, J. ve Panjaworayan, N.T.T., 2012. Inhibitory Effects of Crude Extracts from Some Edible Thai Plants against Replication of Hepatitis B Virus and Human Liver Cancer Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 246.
- Wang, S., Huang, M., Li, J., Lai, F., Lee, H. ve Hsu, Y., 2013. Punicalagin Induces Apoptotic and Autophagic Cell Death in Human U87MG Glioma Cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(11), 1411–1419.
- Wang, X., Wang, S., Liu, Y., Huang, D., Zheng, K., Zhang, Y., Wang, X., Liu, Q., Yang, D. ve Wang, Y., 2015. Comparative Effects of SNX-7081 and SNX-2112 on Cell Cycle, Apoptosis and Hsp90 Client Proteins in Human Cancer Cells. *Oncology Reports*, 33(1), 230–238.
- Wang, X.H., Guo, L.Y., Ma, B., Yang, K.H., Zhang, Q.N., Cao, N. ve Ye, X.P., 2010. Radiotherapy Combined with Temozolomide Treatment for Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. *Tumor*, 30(12), 1056–1064.
- Weinberg, R.A., 1995. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell*, 81(3), 323–330.

- Wesołowska, O., Wiśniewski, J., Sroda-Pomianek, K., Bielawska-Pohl, A., Paprocka, M., Duś, D., Duarte, N., Ferreira, M.J.U. ve Michalak, K., 2012. Multidrug Resistance Reversal and Apoptosis Induction in Human Colon Cancer Cells by Some Flavonoids Present in Citrus Plants. *Journal of Natural Products*, 75(11), 1896–1902.
- Wikman, H., Westphal, L., Schmid, F., Pollari, S., Kropidowski, J., Sielaff-Frimpong, B., Glatzel, M., Matschke, J., Westphal, M., Iljin, K., Huhtala, H., Terracciano, L., Kallioniemi, A., Sauter, G., Müller, V., Witzel, I., Lamszus, K., Kemming, D. ve Pantel, K., 2014. Loss of CADM1 Expression Is Associated with Poor Prognosis and Brain Metastasis in Breast Cancer Patients. *Oncotarget*, 5(10), 3076–3087.
- Wirth, V., 1995. *Die Flechten Baden Württembergs*. Ulmer, 1006 p, Stuttgart.
- Wolterbeek, H.T. ve van der Meer, A.J.G.M., 2005. Optimization, Application, and Interpretation of Lactate Dehydrogenase Measurements in Microwell Determination of Cell Number and Toxicity. *Assay and Drug Development Technologies*, 3(6), 675–682.
- Xu, Y., Luo, Q., Lin, T., Zeng, Z., Wang, G., Zeng, D., Ding, R., Sun, C., Zhang, X.-K. ve Chen, H., 2014. U12, a UDCA Derivative, Acts as an Anti-Hepatoma Drug Lead and Inhibits the mTOR/S6K1 and Cyclin/CDK Complex Pathways. *Plos One*, 9(12), e113479.
- Yildirim, E., Aslan, A., Emsen, B., Cakir, A. ve Ercisli, S., 2012a. Insecticidal Effect of *Usnea longissima* (Parmeliaceae) Extract against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(2), 303–306.
- Yildirim, E., Emsen, B., Aslan, A., Bulak, Y. ve Ercisli, S., 2012b. Insecticidal Activity of Lichens against the Maize Weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(2), 151–156.
- Yilmaz, M., Tay, T., Kivanç, M., Türk, H. ve Türk, A.Ö., 2005. The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Hypogymnia tubulosa* and Its 3-Hydroxyphysodic Acid Constituent. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 60(1-2), 35–38.
- Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü., 2012. Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(2), 7–18.
- Yu, J. ve Chen, Q., 2014. The Plant Extract of *Pao pereira* Potentiates Carboplatin Effects against Ovarian Cancer. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 36–43.

- Yu, J., Ma, Y., Drisko, J. ve Chen, Q., 2013. Antitumor Activities of *Rauwolfia vomitoria* Extract and Potentiation of Carboplatin Effects Against Ovarian Cancer. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 75, 8–14.
- Yücel, O., Odabaşoğlu, F., Güllüce, M., Çalik, Z.Z., Çakir, A., Aslan, A., Yazici, K. ve Halici, M., 2007. Antioxidant and Antimicrobial Properties of a Lichen Species, *Cladonia rangiformis* Growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 101–109.
- Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Tuylu, B.A., Turk, A.O. ve Barutca, B., 2008. Determination of Genotoxic, Antigenotoxic and Cytotoxic Potential of the Extract from Lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *In Vitro. Phytotherapy Research*, 22(1), 118–123.
- Zhang, X., Zhang, W., Cao, W.D., Cheng, G. ve Zhang, Y.Q., 2012. Glioblastoma Multiforme: Molecular Characterization and Current Treatment Strategy (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(1), 9–14.

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Buğrahan EMSEN
Doğum Tarihi ve Yeri : 24.05.1985 / Erzurum
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0338 226 2000 / 3831
e-mail : bemsen@kmu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2015
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2010
Lisans	Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü	2007
Lise	Erzurum Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-Devam ediyor	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi

Burslar

- 1) TÜBİTAK-BİDEB Yurt İçi Doktora Bursu (2011-2015)
- 2) TÜBİTAK-BİDEB Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu (2007-2009)

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler (SCI, SCI-E)

- 1) Kordali, S., **Emsen, B.** ve Yildirim, E., 2013. Fumigant toxicity of essential oils from fifteen plant species against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 23(2): 241-246.
- 2) **Emsen, B.**, Aslan, A., Yildirim, E. ve Ercisli, S., 2013. Toxicity effects of some lichen species extracts against the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 23(2): 193-199.
- 3) Yildirim, E., **Emsen, B.** ve Kordali, S., 2013. Insecticidal effects of monoterpenes on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86: 198-204.
- 4) Yildirim, E., **Emsen, B.**, Aslan, A., Bulak, Y. ve Ercisli, S., 2012. Insecticidal activity of lichens against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(2): 151-156.
- 5) **Emsen, B.**, Yildirim, E., Aslan, A., Anar, M. ve Ercisli, S., 2012. Insecticidal effect of the extracts of *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd. and *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale against adults of the grain weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(2): 145-149.
- 6) Kordali, S., Yildirim, E., Yazici, G., **Emsen, B.**, Kabaagac, G. ve Ercisli, S., 2012. Fumigant toxicity of essential oils of nine plant species from Asteraceae and Clusiaceae against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(1): 11-14.
- 7) **Emsen, B.**, Bulak, Y., Yildirim, E., Aslan, A. ve Ercisli, S., 2012. Activities of two major lichen compounds, diffractaic acid and usnic acid against *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(1): 5-10.
- 8) Yildirim, E., Aslan, A., **Emsen, B.**, Cakir, A. ve Ercisli, S., 2012. Insecticidal effect of *Usnea longissima* (Parmeliaceae) extract against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(2): 303-306.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

- 1) **Emsen, B.**, Togar, B., Aslan, A., Turkez, H. ve Kaya, A., 2015. Antiproliferative, genotoxic and oxidant activities of physodic acid from lichen secondary metabolites against human glioblastoma multiforme cells. *The Second Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*. Uluslararası Kongre (22-25 Nisan), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 483.
- 2) **Emsen, B.**, Kaya, A., Sadi, G. ve Kocabas, A., 2015. Antioxidant extracts of an edible mushroom, *Lactarius deliciosus*, inhibit cell proliferation in liver hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and bacterial growth. *The Second Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*. Uluslararası Kongre (22-25 Nisan), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 484.
- 3) **Emsen, B.**, Togar, B., Turkez, H., Aslan, A. ve Kaya, A., 2015. Extracellular lactate dehydrogenase activity of usnic acid in rat neuron and glioblastoma cell lines. *First International Congress of Turkish One Health*. Uluslararası Kongre (8-10 Nisan), Konya-Türkiye, Sayfa No: 62.
- 4) **Emsen, B.**, Sadi, G. ve Kaya, A., 2015. Anticancer activity of *Bovista plumbea* edible mushroom on liver hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *First International Congress of Turkish One Health*. Uluslararası Kongre (8-10 Nisan), Konya-Türkiye, Sayfa No: 63.
- 5) **Emsen, B.**, Sadi, G., Cinar, S. ve Kaya, A., 2014. Antioxidant effects of methanolic and aqueous extract from *Lentinus tigrinus*. *Third International Molecular Biology and Biotechnology Congress*. Uluslararası Kongre (2-6 Haziran), Saraybosna-Bosna Hersek, Sayfa No: 229.
- 6) **Emsen, B.**, Sadi, G., Cinar, S., Irtem Kartal, D. ve Kaya, A., 2014. Determination of cytotoxic properties of *Schizophyllum commune*. *Third International Molecular Biology and Biotechnology Congress*. Uluslararası Kongre (2-6 Haziran), Saraybosna-Bosna Hersek, Sayfa No: 230.
- 7) Kaya, A., Sadi, G., Cinar Belyurt, S., Kaya, O.F., Uzun, Y. ve **Emsen, B.**, 2014. Antioxidant and antimicrobial activity of an edible mushroom *Volvopluteus gloiocephalus*. *International Environmental Sciences Symposium of Van*. Uluslararası Kongre (4-7 Haziran), Van-Türkiye, Sayfa No: 167.
- 8) **Emsen, B.**, Yildirim, E. ve Kordali, S., 2013. Herbal solution against maize weevil. *The Second International Conference on Water, Energy & Environment*. Uluslararası Kongre (21-24 Eylül), Kuşadası-Türkiye, Sayfa No: 397.

- 9) Agar, O., Boztosun, I., **Emsen, B.** ve Aslan, A., 2013. Determination of radioactivity levels and radiological hazards of lichen samples. *The Second International Conference on Water, Energy & Environment*. Uluslararası Kongre (21-24 Eylül), Kuşadası-Türkiye, Sayfa No: 357.
- 10) **Emsen, B.**, Aslan, A. ve Yildirim, E., 2013. Adulticidal activity of two lichen extracts on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *The Second International Conference on Water, Energy & Environment*. Uluslararası Kongre (21-24 Eylül), Kuşadası-Türkiye, Sayfa No: 316.
- 11) Yildirim, E., **Emsen, B.** ve Aslan, A., 2011. Insecticidal activities of two major lichen compounds (diffractaic and usnic acid) against *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculionidae). *Medicinal and Aromatic Plants in Generating of New Values in 21st Century*. Uluslararası Kongre (9-12 Kasım), Saraybosna-Bosna Hersek, Sayfa No: 228.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

- 1) **Emsen, B.**, Sadi, G., Kaya, A. ve Çınar Belyurt, S., 2014. *Coprinus comatus* (Agaricaceae)'un antioksidan aktiviteleri ve antioksidan içerikleri üzerine *in vitro* çalışmalar. 1. *Ulusal Botanik / Bitki Bilimi Kongresi*. Ulusal Kongre (25-28 Ekim), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 46.
- 2) **Emsen, B.**, Sadi, G., Kaya, A., Çınar Belyurt, S. ve İrtem Kartal, D., 2014. Yenilebilir *Volvopluteus gloiocephalus* (Pluteaceae)'un HepG2 hücre hatları üzerindeki toksik etkilerinin tespiti. 1. *Ulusal Botanik / Bitki Bilimi Kongresi*. Ulusal Kongre (25-28 Ekim), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 47.
- 3) Anar, M., Aslan, A., Ağar, G., Alpsoy, L., **Emsen, B.** ve Çeker, S., 2012. *Parmelia* liken türlerinden elde edilen total özütün antimitojenik ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*. Ulusal Kongre (15-18 Kasım), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 134.
- 4) **Emsen, B.**, Talaz, O. ve Aslan, A., 2012. *Pseudeverina furfuracea* L. (Zopf.) liken türünün biyolojik moleküllerinin ekstraksiyon ve karakterizasyonu. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*. Ulusal Kongre (15-18 Kasım), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 135.
- 5) **Emsen, B.**, Bozan, D., Tüzün Tereshenko, E., Sadi, G., Kocabas, A. ve Kaya, A., 2012. *In vitro* ortamda *Schizophyllum commune* ve *Tricholoma fracticum* türlerinin serbest radikal yakalama aktivitelerinin ve biyoaktif içeriklerinin incelenmesi. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*. Ulusal Kongre (15-18 Kasım), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 136.

- 6) Örtücü, S., Aydoğan, M.N., Özdal, M. ve Emsen, B., 2012. Lokal olarak izole edilen *Trichoderma* türlerinin kitinaz aktivitelerinin belirlenmesinde Bromocresol Purple boyasının kullanımı ve yüksek kitinaz üreten izolatların moleküler karakterizasyonu. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. Ulusal Kongre (15-18 Kasım), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 137.

Projeler

- 1) Liken sekonder metabolitlerinin deneysel beyin tümör modeli üzerine potansiyel etkilerinin *in vitro* yöntemlerle araştırılması. Bilimsel Araştırma Projesi (BAP/01-D-13), Araştırmacı, 2013-2015.
- 2) Karaman yöresinde yetişen bazı yenilebilir makromantar türlerinin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi. Bilimsel Araştırma Projesi (BAP/37-M-12), Araştırmacı, 2012-2013.

Bilimsel Faaliyetler

- 1) 1. Ulusal Botanik / Bitki Bilimi Kongresi Düzenleme Kurulu Başkan Yardımcılığı ve Sekreteryalığı. Ulusal Kongre (25-28 Ekim 2014), Antalya-Türkiye.
- 2) 3. Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi Sekreteryalığı. Uluslararası Kongre (02-06 Haziran 2014), Saraybosna-Bosna Hersek.
- 3) TÜBİTAK-BİDEB, 2237-Proje Eğitimi Etkinlikleri Destekleme Programı, Mühendislik ve Fen Bilimlerinde TÜBİTAK Araştırma Projesi Hazırlama Eğitimi. 27-29 Ocak 2014, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman-Türkiye.
- 4) 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi Sekreteryalığı. Ulusal Kongre (15-18 Kasım 2012), Antalya-Türkiye.
- 5) TÜBİTAK Bilgilendirme ve Eğitim Semineri. 05 Ocak 2012, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman-Türkiye.
- 6) Yaz Bilim Okulu Eğitmenliği ve Rehber Öğretmenliği. 4-22 Temmuz 2011, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi - Karaman Bilim ve Araştırma Merkezi, Karaman-Türkiye.
- 7) Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı Araştırma Görevlileri Çalıştayı. 29 Haziran 2011, Hacettepe Üniversitesi, Ankara-Türkiye.

- 8)** 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi Sekretaryalığı. Ulusal Kongre (26-29 Ekim 2010), Antalya-Türkiye.
- 9)** 1. Ulusal Su Kaynakları Yönetimi Sempozyumu Sekretaryalığı. Ulusal Sempozyum (20-22 Ekim 2010), Karaman-Türkiye.
- 10)** 2. Ulusal Alabalık Sempozyumu Sekretaryalığı. Ulusal Sempozyum (06-08 Temmuz 2010), Karaman-Türkiye.
- 11)** 1. Ulusal Elma Sempozyumu. 20-22 Ekim 2009, Karaman-Türkiye.
- 12)** Epidemiyoloji ve Biyoistatistik Kursu. 5 Nisan 2009, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erzurum-Türkiye.