



**BAZI LİKEN ASİTLERİNİN ANTİMİGRASYON
ETKİSİNİN KARACİĞER ve AKCİĞER KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -
KATENİN YOLAKLARI ÜZERİNDEN
ARAŞTIRILMASI**

Berna HUKKAMLI

Danışman: Prof. Dr. Harun BUDAK
Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2024
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**BAZI LİKEN ASİTLERİNİN ANTİMİGRASYON ETKİSİNİN KARACİĞER ve
AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -
KATENİN YOLAKLARI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of the Anti-Migration Effect of Some Lichen Acids on PI3K/AKT/mTOR and
WNT/ β -CATENIN Pathways in Liver and Lung Cancer Cell Lines)

DOKTORA TEZİ

Berna HUKKAMLI

Danışman: Prof. Dr. Harun BUDAK

Erzurum
Ağustos, 2024

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Berna HUKKAMLI tarafından hazırlanan “BAZI LİKEN ASİTLERİNİN ANTİMİGRASYON ETKİSİNİN KARACİĞER ve AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -KATENİN YOLAKLARI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI” başlıklı çalışması 07 / 08 / 2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Genetik Bilim Dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Alptuğ ATİLA <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır.
Danışman:	Prof. Dr. Harun BUDAK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır.
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır.
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır.
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Yeliz DEMİR <i>Ardahan Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır.

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP Doktora Tez Projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2023-12382

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Harun BUDAK danışmanlığında sunulan “BAZI LİKEN ASİTLERİNİN ANTİMİGRASYON ETKİSİNİN KARACİĞER ve AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -KATENİN YOLAKLARI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	8	30
Materyal ve Yöntem	28	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	5	20
Sonuç ve Öneriler	6	20
Tezin Geneli	15	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Berna HUKKAMLI	Prof. Dr. Harun BUDAK
14.8.2024	14.8.2024
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen, FDK-2023-12382 kodlu "Bazı Liken Asitlerinin Antimigrasyon Etkisinin Karaciğer ve Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -KATENİN Yolakları Üzerinden Araştırılması" başlıklı Doktora Tez Projesi kapsamında hazırlanan bu tez çalışması Sayın Prof. Dr. Harun BUDAK yöneticiliğinde tamamlanmıştır. Bu tez çalışmasına verdikleri destekten dolayı öncelikli olarak Atatürk Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Doktora danışmanlığımı üstlenen, çalışma süresince her türlü yardım ve destekle bulunan, bilgi ve tecrübelerinden her daim faydalandığım çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Harun BUDAK'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın tüm aşamalarında fakültemizin ve bölümümüzün imkânlarını esirgemeyen bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesi'nde yer alan kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Alptuğ ATİLA ve Sayın Doç. Dr. Yağmur ÜNVER'e değerli katkıları için teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarım boyunca her aşamada yanımda olan ve her anlamda desteğini hissettiğim Sayın Doç. Dr. Ahmet ALTAY'a, Sayın Nurgül ABUL'a, Sayın Arş. Gör. Şükran GÜNAYDIN'a, Sayın Öğr. Gör. Kübra Nur BAYINDIRLI'ya ve canım arkadaşım Sayın Feyza SÖNMEZ AYDIN'a teşekkür ederim. Yine bu sürecin her aşamasında beni motive eden ve manevi desteklerini her daim hissettiren sevgili oda arkadaşlarım, Sinop Üniversitesi akademik personellerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YILDIZ UZUN ve Sayın Öğr. Gör. Hilal Zeynep ŞAHİN BAYRAK'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin belirli bir sürecinde YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ile sağladığı maddi destekten dolayı Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK) teşekkür ederim.

Çalışmalarımın belirli aşamalarını gerçekleştirmem için bana kapılarını açan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (KİTAM) teşekkür ederim.

Bana bu yolda her türlü sabrı, anlayışı, fedakârlığı ve desteği gösteren başta annem olmak üzere kıymetli aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Berna HUKKAMLI

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BAZI LİKEN ASİTLERİNİN ANTİMİGRASYON ETKİSİNİN KARACİĞER ve AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -KATENİN YOLAKLARI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI

Berna HUKKAMLI

Danışman: Prof. Dr. Harun BUDAK

Amaç: Bu tez kapsamında, akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanserleri üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiş difraktaik, vulpinik ve evernik liken asitlerinin, migrasyon, invazyon ve metastaz başta olmak üzere kanserin birçok karakteristik özelliğinin ortaya çıkmasında kritik rol oynayan WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Yöntem: A549 ve HepG2 hücre hatları, önceden belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarında difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edildi. Liken asitleri ile muamele edilmiş hücre hatlarında WNT/ β -KATENİN yolağı genleri olan *WNT2*, *AXIN1*, *DVL1*, *CTNNB1*, *TCF4*, *MYC*, *CDK1*, *CCND1* ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı genleri *AKT*, *mTOR*, *PI3K* ve *PTEN*'nin kantitatif ekspresyon seviyeleri Real Time PCR analizi ile belirlendi. WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarında kritik role sahip hedef proteinlerin ekspresyon değişimleri western blot analizi ile belirlendi. Ek olarak, WNT/ β -KATENİN sinyal yolağı düzenleyicilerinden biri olan CSNK1E enziminin miktarı ELISA metoduyla belirlendi.

Bulgular: Difraktaik ve vulpinik asidin A549 hücre hattında WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR yolları üzerine etkisini özellikle protein seviyeleri üzerinden gösterdiği görülmüştür. Evernik asidin ise bu hücre hattında, yolak bileşenlerini hem gen hem de protein seviyesinde hedef almakla birlikte hücre döngüsü düzenleyicilerinin gen ekspresyonunu önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. HepG2 hücre hattında ise difraktaik ve vulpinik asidin her iki yolak üzerinde gen ve protein seviyesinde etkili olduğu, evernik asidin ise daha az sayıda bileşeni etkilediği görülmüştür.

Sonuç: Bu bulgular, üç liken asidinin de A549 hücre hattında WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR yollarına ait farklı bileşenleri gen ve/veya protein seviyesinde spesifik olarak etkileyerek antimigrasyon potansiyellerini ortaya koyduğunu göstermiştir. HepG2 hücre hattında ise difraktaik ve vulpinik asidin her iki yolakta kritik gen ve proteinlerin seviyesinde etkili olduğu açıkça görülmüştür. Diğer liken asitleriyle karşılaştırıldığında, evernik asidin, antimigrasyon ve antiproliferatif aktivitesini desteklemek için bu yolların sadece birkaç bileşenini hedef aldığı ve bu etkilerini araştırılan sinyal yollarından farklı bir mekanizma ile gerçekleştiriyor olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: HepG2, A549, PI3K/AKT/mTOR yolağı, WNT/ β -KATENİN yolağı, antimigrasyon, antikanser

Ağustos 2024, 143 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

ANTI-MIGRATION EFFECT OF SOME LICHEN ACIDS IN LIVER AND LUNG CANCER CELL LINES RESEARCH ON PI3K/AKT/mTOR and WNT/ β -CATENIN PATHWAYS

Berna HUKKAMLI

Supervisor: Prof. Dr. Harun BUDAK

Purpose: In this thesis, the effects of diffractaic, vulpinic and evernic lichen acids, whose cytotoxic effects on lung (A549) and liver (HepG2) cancers have been determined, on WNT/ β -CATENIN and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways, which play a critical role in the emergence of many characteristic features of cancer, especially migration, invasion and metastasis, were investigated.

Methods: A549 and HepG2 cell lines were treated with diffractaic, vulpinic, and evernic acids at the determined IC₅₀ concentrations in a time- and dose-dependent manner. The quantitative expression levels of *WNT2*, *AXIN1*, *DVL1*, *CTNNB1*, *TCF4*, *MYC*, *CDK1*, *CCND1*, and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway genes *AKT*, *mTOR*, *PI3K* and *PTEN* were investigated by Real Time PCR analysis. Expression changes of target proteins with critical roles in WNT/ β -Catenin and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways were examined by western blot analysis. In addition, the amount of CSNK1E enzyme, one of the regulators of WNT/ β -Catenin signaling pathway, was determined by ELISA method.

Findings: In the A549 cell line, diffractaic and vulpinic acid showed effects on the WNT/ β -Catenin and PI3K/AKT/mTOR pathways, especially at the protein level, whereas evernic acid targeted pathway components at both gene and protein levels and significantly decreased cell cycle regulator gene expression. In HepG2 cell line, diffractaic and vulpinic acid were effective on both pathways at gene and protein levels, while evernic acid affected fewer components.

Results: These findings demonstrated that all three lichen acids revealed their antimigration potential by specifically affecting different components of the WNT/ β -Catenin and PI3K/AKT/mTOR pathways at the gene and/or protein level in the A549 cell line. In the HepG2 cell line, it was clearly demonstrated that diffractaic and vulpinic acid were effective at the level of critical genes and proteins in both pathways. Evernic acid, when compared to other lichen acids, targeted only a few components of these pathways to support its antimigration and antiproliferative activity and may be exerting these effects through a mechanism different from these signaling pathways.

Keywords: HepG2, A549, PI3K/AKT/mTOR pathway, WNT/ β -Catenin pathway, antimigration, lichens

August 2024, 143 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	xvi
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
Kanser	4
HücreseL Orjinlerine Göre Kanser Türleri.....	4
Kanser Hücrelerinin Ayırt Edici Özellikleri	6
Proliferatif Sinyalleşmenin Sürdürülmesi	6
Büyüme Baskılayıcılarından Kaçınma.....	7
HücreseL Ölüme Direnç.....	8
Metastaz ve İnvazyon.....	11
Anjiyogenez	12
Kanser Prevalansı.....	14
Akciğer Kanseri	18
Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	19
Adenokarsinom:	19
Skvamöz hücreli karsinom:.....	19
Büyük hücreli karsinom:	19
Küçük Hücreli Akciğer Kanseri.....	20
Akciğer KanserinE Etiyolojisi.....	20
Akciğer Kanseri Evrelemesi ve Tedavi Yöntemleri	20
Hepatoselüler Karsinom.....	22
Hepatoselüler Karsinom Etiyolojisi	23
Hepatoselüler Karsinoma Evrelemesi ve Tedavi Yöntemleri.....	25

WNT/ β -Katenin Sinyal Yolağı	26
Kanonik (β -KATENİN bağımlı) WNT Sinyal Yolağı.....	26
Kanonik Olmayan (β -KATENİN Bağımsız) WNT Sinyal Yolağı	27
PI3K/AKT/mTOR Yolağı.....	28
PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -KATENİN Sinyal Yolaklarının Kanserdeki Rolü	31
Hücre Döngüsü Düzenleyicilerinin Kanserdeki Rolü.....	32
Kanser Tedavi Yöntemleri	34
Cerrahi Müdahale.....	35
Kemoterapi.....	35
İmmunoterapi	35
Radyoterapi	36
Gen Terapisi	36
Likenler	37
Liken Sekonder Metabolitleri	37
Liken Sekonder Metabolitlerinin Biyolojik Aktiviteleri.....	38
Antioksidan aktivite	38
Antimikrobiyal aktivite	38
Anti-inflamatuvar aktivite.....	39
Antikanser ve sitotoksik aktivite.....	39
Tez Kapsamında Çalışılan Liken Asitleri	42
MATERYAL ve METOD	44
Kullanılan Kimyasallar	44
Kullanılan Materyaller ve Cihazlar.....	45
Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	46
Hücre Kültürü.....	47
Hücrelerin pasajlanması	48
Hücrelerin dondurulması.....	48
Hücrelerin sayımı	48
Liken asitlerinin hazırlanması	49
Hücrelerin liken asitleri ile muamelesi	49
Kantitatif Gen Ekspresyon (Real Time PCR) Analizi	49
Total RNA izolasyonu.....	49
Total RNA'ların saflık derecesi ve konsantrasyonunun belirlenmesi.....	51
cDNA sentezi	52
Primer dizaynı	52

Real Time PCR analizi.....	59
Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	59
Western Blot Yöntemi ile Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi	59
A549 ve HepG2 hücrelerinden protein homojenatının hazırlanması.....	59
Bradford (Coomasie Blue) protein tayini.....	60
SDS Jelinin Hazırlanması ve Yüklenmesi	62
Jeldeki proteinlerin membrana transfer edilmesi (blotlama), bloklanması ve görüntülenmesi.....	64
Enzime Bağlı Immunosorbent Testi (ELISA).....	65
Standart eğrinin hazırlanması.....	66
Kit prosedürü.....	67
ARAŞTIRMA BULGULARI	68
Hücre Proliferasyon Analizi (XTT) Sonuçları.....	68
Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları	68
Difraktaik, Vulpinik ve Evernik Asit İle Muamele Edilen A549 ve HepG2 Kanser Hücre Hatlarında Kantitatif Gen Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi	69
Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi (Western Blot) Sonuçları	81
CSNK1E Enzim Miktarının ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	92
TARTIŞMA.....	93
Sonuç ve Öneriler.....	102
KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	123

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Dünya Genelinde 2022 Yılında Yaşlara Göre Kanser Türlerinin Vaka Sayı ve Oranları (Cinsiyetten Bağımsız)	15
Tablo 2. Hepatoselüler Karsinoma Evrelemesi	25
Tablo 3. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	44
Tablo 4. Tez Kapsamında Kullanılan Materyal ve Cihazlar.....	45
Tablo 5. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	46
Tablo 6. A549 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC ₅₀ Konsantrasyonunda Difraktaik ve Vulpinik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Total RNA Saflık Derecesi ve Konsantrasyonu.....	51
Tablo 7. A549 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC ₅₀ Konsantrasyonunda Evernik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Total RNA Saflık Derecesi ve Konsantrasyonu.....	51
Tablo 8. HepG2 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC ₅₀ Konsantrasyonunda Difraktaik ve Vulpinik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Total RNA Saflık Derecesi ve Konsantrasyonu.....	51
Tablo 9. HepG2 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC ₅₀ Konsantrasyonunda Evernik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Total RNA Saflık Derecesi ve Konsantrasyonu	52
Tablo 10. cDNA Sentezi İçin Kullanılan Bileşenler ve Hacimleri.....	52
Tablo 11. Tez Kapsamında Real Time PCR ile Gen Ekspresyon Profillerine Bakılan Genler İçin Dizayn Edilen Primerlerin Listesi.....	58
Tablo 12. Real Time PCR İçin Bir Tüp İçerisindeki Karışım	59
Tablo 13. SYBR Green Real Time PCR Protokolü.....	59
Tablo 14. Bradford Protein Tayini Deney Protokolü.....	61
Tablo 15. A549 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC ₅₀ Dozunda Difraktaik ve Vulpinik Asidin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proteinlerin 595 nm’de Verdikleri Absorbans ve Protein Miktarları	61
Tablo 16. A549 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC ₅₀ Dozunda Evernik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proteinlerin 595 nm’de Verdikleri Absorbans ve Protein Miktarları..	61
Tablo 17. HepG2 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC ₅₀ Dozunda Difraktaik ve Vulpinik Asidin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proteinlerin 595 nm’de Verdikleri Absorbans ve Protein Miktarları	62

Tablo 18. HepG2 Hücre Hattı için Belirlenen IC ₅₀ dozunda Evernik Asidin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proteinlerin 595 nm’de Verdikleri Absorbans ve Protein Miktarları	62
Tablo 19. SDS-PAGE İçin Kullanılan Ayırma Jeli Değerleri	63
Tablo 20. SDS-PAGE İçin Kullanılan Yükleme Jeli Değerleri.....	63
Tablo 21. Western Blot Çalışması İçin Kullanılan Primer Antikorlara Ait Bilgiler	65
Tablo 22. Western Blot Çalışması İçin Kullanılan Sekonder Antikorlara Ait Bilgiler	65
Tablo 23. Standart Çözeltilerin Seyreltilmesi İçin İzlenen Prosedür.....	67
Tablo 24. Liken Asitlerinin (Difraktaik, Vulpinik ve Evernik Asit İnsan Akciğer (A549) ve Karaciğer (HepG2) Kanseri Hücre Hatları Üzerine Uygulanması Sonucu Belirlenen IC ₅₀ (µg/ml) Konsantrasyonları (Günaydın 2022; Sulukoğlu 2022).....	68



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Apoptoz mekanizması.....	9
Şekil 2. Programlanmış hücre ölüm mekanizmaları.	11
Şekil 3. Metastaz sürecinin aşamaları	12
Şekil 4. Anjiyogenez sürecinin aşamaları	13
Şekil 5. Dünya genelinde 2022 yılında kanser türlerinin vaka sayısı ve oranları.....	14
Şekil 6. Dünya genelinde 2022 yılında kanser nedenli ölümlerin sayısı ve oranları.....	16
Şekil 7. Dünya genelinde 2022 yılında kanser türlerinin kadın ve erkeklerdeki görülme sayısı ve oranları	17
Şekil 8. Dünya genelinde 2022 yılında kadın ve erkeklerdeki kanser nedenli ölümlerin sayısı ve oranları	18
Şekil 9. Karaciğer fibrozisi oluşumu.....	24
Şekil 10. WNT/ β -KATENİN sinyal yolağına genel bakış.....	27
Şekil 11. Kanonik olmayan (β -KATENİN bağımsız) WNT sinyal yolağı	28
Şekil 12. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına genel bakış	29
Şekil 13. Hücre döngüsü kontrol noktaları.....	33
Şekil 14. Likenlerin temel morfolojisi	37
Şekil 15. Difraktaik asidin kimyasal yapısı.....	42
Şekil 16. Vulpinik asidin kimyasal yapısı	42
Şekil 17. Evernik asidin kimyasal yapısı	43
Şekil 18. Primer dizayn etmek için kullanılan NCBI anasayfası	53
Şekil 19. Primer dizayn etmek için kullanılan NCBI organizma seçim sayfası.....	53
Şekil 20. İlgili geninin nükleotit sekansına ulaşılabilir bağlantı linklerinin bulunduğu NCBI sayfasının üst tarafı.....	54
Şekil 21. İlgili genin nükleotit sekansına ulaşılabilir bağlantı linklerinin bulunduğu NCBI sayfası alt tarafı	54
Şekil 22. İlgili genin nükleotit sekansına ulaşılabilir bağlantı linkinin bulunduğu NCBI sayfası.....	54
Şekil 23. İlgili genin sekansının FASTA formantında gösterildiği NCBI sayfası	55
Şekil 24. Primer ve prob dizaynında kullanılan veri tabanı	56
Şekil 25. İlgili gen için dizayn edilen primer dizilerinin özelliklerinin girildiği sekme	56
Şekil 26. İlgili gen için dizayn edilen primer dizilerinin özellikleri	56

Şekil 27. Dizayn edilen primerlerin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası.....	57
Şekil 28. Dizayn edilen primerlerin BLAST sonuç sayfası	57
Şekil 30. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>WNT2</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	69
Şekil 31. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>CTNNB1</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	69
Şekil 32. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>DVLI</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	70
Şekil 33. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>AXIN1</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	70
Şekil 34. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>TCF-4</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	71
Şekil 35. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>CCND1</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	71
Şekil 36. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>CDK1</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	72
Şekil 37. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>MYC</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	72
Şekil 38. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>PI3K</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	73
Şekil 39. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>AKT</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	73

Şekil 40. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>mTOR</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	74
Şekil 41. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında <i>PTEN</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	74
Şekil 42. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>WNT2</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	75
Şekil 43. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>CTNNB1</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	75
Şekil 44. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>DVLI</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	76
Şekil 45. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>AXIN1</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	76
Şekil 46. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>TCF-4</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	77
Şekil 47. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>CCND1</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	77
Şekil 48. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>CDK1</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	78
Şekil 49. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>MYC</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	78
Şekil 50. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>PI3K</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	79

Şekil 51. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>AKT</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	79
Şekil 52. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>mTOR</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	80
Şekil 53. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında <i>PTEN</i> geninin mRNA ekspresyon değişimi	80
Şekil 54. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde WNT2 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	81
Şekil 55. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde CTNNB1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	82
Şekil 56. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde DVL1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	83
Şekil 57. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde AXIN1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	84
Şekil 58. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde AKT kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	85
Şekil 59. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde PTEN kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	86
Şekil 60. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde WNT2 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	87
Şekil 61. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde CTNNB1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	88

Şekil 62. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde AXIN1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	89
Şekil 63. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde AKT kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	90
Şekil 64. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde PTEN kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi	91
Şekil 65. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde CSNK1E miktarı üzerine etkisi	92
Şekil 66. Belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde CSNK1E miktarı üzerine etkisi	92
Şekil 67. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında WNT/β-KATENİN sinyal yolağı bileşenlerinin gen ekspresyon seviyesi üzerine etkisi	103
Şekil 68. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı bileşenlerinin gen ekspresyon seviyesi üzerine etkisi	104
Şekil 69. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında WNT/β-KATENİN sinyal yolağı bileşenlerinin protein ekspresyon seviyesi üzerine etkisi	104
Şekil 70. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında WNT/β-KATENİN sinyal yolağı elemanı CSNK1E ELISA analizi sonuçları	104
Şekil 71. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı kritik bileşenlerinin protein ekspresyon seviyesi üzerine etkisi	105

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

AJCC	: Akciğer Kanseri Amerikan Kanser Ortak Komitesi
AKT	: Protein kinaz B
Apaf-1	: Apoptotik Peptidaz Aktive Edici Faktör 1
APC/C	: Anafaz İlerletici Bileşik/Siklozom
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli Proteini
ATS	: Amerikan Toraks Derneği
AXIN	: Eksen İnhibisyon Proteini
BCLC	: Barselona-Klinik-Karaciğer Kanseri
bFGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CHL	: Hodgkin Lenfoma
CK1	: Kazein Kinaz 1
CK1α	: Kazein Kinaz 1 alfa
CO₂	: Karbondioksit
CSNK1E	: Kasein Kinaz 1 epsilon
CTNNB1	: Beta-KATENİN
DISC	: Hücre Ölümünü İndükleyen Sinyal Kompleksi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DVL	: Dishevelled Protein
EBUS	: Endobronşiyal Ultrason
ECM	: Hücre Dışı Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ERS	: Avrupa Respiratuar Hastalıklar Derneği
GLOBOCAN	: Küresel Kanser Gözlem Verisi
GSK3	: Glikojen Sentaz Kinaz-3
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
HER	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü

HIF	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFR-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü 1
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
LEF	: Lenfoid Arttırıcı-Bağlayıcı Faktör
LRP5/6	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MOMP	: Mitokondri Dış Zarının Geçirgenliği
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mTOR	: Rapamisin Kinazın Mekanistik Hedefi
NAFLD	: Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
PCNA	: Hücre Çekirdeği Antijeni
PEL	: Birincil Efüzyon Lenfoma
PET-CT	: Pozitron Emisyon Tomografisi ile Birlikte Bilgisayarlı Tomografi Taraması
PI3K	: Fosfatidilinositol 4,5-Bisfosfat 3-Kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5-Bisfosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol 3,4,5-Trisfosfat
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
TCF	: T Hücrelerine Özgü Faktör
TNF-R	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
TRAIL-R	: TNF ile İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand Reseptörleri
TRXR1	: Tioredoksin Redüktaz 1
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve İlgili Reseptör
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram

μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
dk	: Dakika
g (RCF)	: Göreceli santrifüj kuvveti
g	: Gram
h	: Saat
KDa	: Kilodalton
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
ng	: Nanogram
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saniye
$\mu\text{g/mL}$: Mikrogram/ mikrolitre
μm	: Mikrometre

GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve vücudun yakın veya uzak bölgelerine kan ve lenf yoluyla yayılarak hasar oluşturma yeteneği ile karakterize edilen, yaklaşık 200 farklı türü bulunan bir hastalıktır. Dünyada bilinen ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sırada kanser yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 15-49 yaş aralığında, meme kanseri (% 13) en sık görülen malignite olup, bu oranı karaciğer (% 12) ve akciğer (% 9) kanserleri izlemektedir. 50-59 yaş aralığında ise, en sık görülen malignite akciğer kanseri (%18) olup bunu karaciğer (% 11) ve meme (% 9) kanserleri takip ederken, 60 yaş ve üstünde en sık görülen maligniteler akciğer (% 21), kolorektal (% 9), mide (% 9) ve karaciğer (% 9) kanserleri olarak bildirilmektedir (Mattiuzzi ve Lippi 2019).

Araştırma kapsamında çalışılacak olan karaciğer kanseri, dünya çapında 1 milyondan fazla insanı etkileyen ve 2016 yılında 800.000 ölüme neden olan yaygın ölümcül bir malignitedir (Liu vd 2019). Karaciğer kanserinin çeşitli alt tiplerinin olmasına karşın hepatosellüler karsinom (HCC), tüm karaciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 80'ini oluşturmaktadır. Hepatit B (HBV) ve Hepatit C virüsü (HCV) ile kronik enfeksiyon, aşırı alkol alımı, aflatoksine maruz kalma, diyabet ve obezite HCC ile ilişkili etiyolojik faktörlerin arasında yer almaktadır (Baffy vd 2012).

Akciğer kanseri ise başta tütün kullanımı olmak üzere, pasif içicilik, asbest ve radon gazına maruz kalma, alkol ve işlenmemiş gıda tüketimi faktörler nedeniyle dünya genelinde insidansı kritik oranda artan bir kanser türüdür. Yirminci yüzyılın son on yılından beri akciğer kanseri en sık görülen kanser türü olmuştur (Dubey vd 2016).

Kanser epidemiyoloji üzerine yapılan çalışmalar, yeni tedavi ve terapi yöntemlerinin araştırılması üzerine yoğunlaşan ilgiyi açıklamaktadır. Kanser tedavisinde, agresiflik seviyesi, metastaz, heterojenite ve tümör boyutu gibi özellikler göz önüne alınarak kemoterapi, cerrahi müdahale, endokrin ve radyasyon tedavisi gibi geleneksel yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (Mun vd 2017). Bu tedavi yöntemleri kanserli hücrelerde oldukça etkili olsa da yol açtıkları yan etkiler ve kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç sorun oluşturmaktadır. Özellikle kemoterapik ilaçların kullanımında, kanser hücreleriyle birlikte sağlıklı hücrelerin de hedef alınması ve doğru evrelemenin yapılamaması durumunda hastanın bağışıklık sisteminde zayıflama, bulantı ve şiddetli ağrılar görülmektedir (Senapati vd 2018, Yadav vd 2017, Pearce

vd 2017). Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalar, konvensiyonel yöntemlerin yanında farklı terapötik ajanlar üzerine yoğunlaşmaktadır. Bununla birlikte, doğal kaynaklar ve bunların metabolitleri, yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde umut verici ajanlar olarak kullanılmaktadır (Mondal vd 2012).

Doğal ürünler antik çağlardan itibaren insan hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır (Naem vd 2022). 1981 ve 2019 yılları arasında onaylanan küçük moleküllü ilaçların %32'sinin doğal ürünler ve bunların türevleri olduğu bilinmektedir (Mondal vd 2012; Newman ve Cragg 2016; 2020). Ayrıca 2016 yılında yayınlanan raporda 1827 yılından 2013 yılına kadar ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin (FDA), 547 doğal ürün ve bunların türevlerinin başta kanser, bakteriyel enfeksiyonlar ve hipertansiyon olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılmasını onayladığı belirtilmektedir (Patridge vd 2016). Bu tür doğal bileşiklerin elde edilmesi için yeni bir kaynak olan likenler son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. Likenlerin ve bunların sekonder metabolitlerinin sitotoksitesi ve genotoksitesi ile ilgili çalışmaların sayısı son yıllarda artmıştır (Shrestha ve St. Clair 2013, Kalın 2022,2023; Günaydın 2023; Sulukoğlu 2024). Likenler mantar (mikrobiyont) ve alg veya siyanobakteri (fotobiyont) arasındaki simbiyotik ilişki ile oluşan alifatik, sikloalifatik, aromatik ve terpenik bileşikler içeren birçok sekonder metabolit sentezleyen kompleks yapıdaki organizmalardır. Likenler ve metabolitleri antioksidan, antiviral, antibiyotik, antinflamatuar ve antikanser birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Huneck 1999).

Yapılan araştırmalar kapsamında elde edilen bulgular difraktaik, evernik ve vulpinik asidin insan meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerinde doz ve zamana bağlı, TRXR1 hedefli olarak antikanser etki gösterdiği görülmüştür. Ancak bu etkiyi apoptozdan ziyade çoğunlukla migrasyonu engelleyerek gösterdiği belirlenmiştir (Kalın 2022). Yine yapılan diğer çalışmalarda akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında difraktaik, evernik ve vulpinik asidin doz ve zamana bağlı olarak antikanser etkisi kanıtlanmış olup, başta evernik asit olmak üzere bu etkiyi apoptozu desteklemekle birlikte migrasyonu önemli derecede engelleyerek gösterdikleri belirlenmiştir (Günaydın 2022; Sulukoğlu 2022).

Literatürde tez kapsamında çalışılan liken asitlerinin (difraktaik asit, vulpinik asit ve evernik asit) kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve antimigrasyon etkisini hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiği hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında liken asitlerinin antiproliferatif ve antimigrasyon potansiyelinin moleküler mekanizmasını aydınlatmak amacıyla, migrasyon, invazyon ve metastaz başta olmak üzere

kanserin birçok karakteristik özelliğinin ortaya çıkmasında rol oynayan iki kritik yolak, WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR yolakları, aday olarak seçilmiştir. Bu iki sinyal yolağının malignant tümörlerin geniş bir aralığında kritik rollere sahip olduğu bilindiğinden liken asitlerinin bu yolağı hedefleyip hedeflemediğinin belirlenmesi sadece bu kanser türü için değil birçok kanser türü için yeni terapötik yaklaşımlara ışık tutacaktır.



KURAMSAL TEMELLER

Kanser

Kanser, DNA'nın ekzojen ve endojen etkenler ile hasarı sonucu, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasıyla karakterize edilen ölümcül bir hastalıktır (Hausman 2019). Eski hücrelerin yıkılmaması ve kontrolsüz bir şekilde büyümeye devam ederek yeni anormal hücreler oluşturması ile tümör adı verilen doku kütlesi meydana gelir (Hazafa vd 2019).

Kanser farklı yolların düzensizliğinden kaynaklanabilen genetik temelli bir hastalık olup bu yollar normal hücrelerin proliferasyon, sağkalım, farklılaşma ve metabolik faaliyetlerini düzenleyen sistemlerdir (Schulze ve Harris 2012; Vazquez vd 2016). Bu yolların anormal aktivasyonu veya inaktivasyonu kontrolsüz proliferasyon, azalmış apoptoz, çoğalma sinyallerini sürdürme, büyüme baskılayıcılarından kaçma ve genetik instabilite gibi özelliklerle karakterize edilen kanser hücrelerinin oluşmasına neden olur. Bazı yollar spesifik olarak bir kanser türünü etkileyebilir, bazıları ise malignant tümörlerin geniş bir skalasında oldukça önemli rollere sahip olabilir (Park vd 2020).

Tütün ve alkol kullanımı, iyonize ve ultraviyole radyasyon, viral enfeksiyonlar (örneğin, Hepatit B, Hepatit C, insan papilloma virüsü HPV), parazitler (örneğin, *Schistosomiasis*), bakteriyel enfeksiyonlar (örneğin, *Helicobacter pylori*), yiyecek ve içeceklerin kontaminasyonu (örneğin, aflatoksin kontaminasyonu) kanserin en sık görülen nedenleri arasındadır (Hazafa vd 2019).

Hücresel Orjinlerine Göre Kanser Türleri

Kanser vücuttaki farklı hücre türlerinden kaynaklanabilir ve hücresel orjinlerine göre sınıflandırılabilir. Bu sınıfların her biri büyüme hızı, hücrelerin farklılaşma durumu, metastatik potansiyel, invazif karakter ve tedaviye yanıt açısından değişiklik göstermektedir. (Vazquez vd 2016). Kanser, karsinoma, sarkoma, lösemi, lenfoma, melanoma, miyeloma ve merkezi sinir sistemi kanserleri olmak üzere birçok alt sınıfa ayrılabilir.

Karsinomlar vücudun deri, meme, prostat, akciğer ve bağırsak gibi epitelyal dokularında başlar ve en yaygın görülen kanser sınıfıdır. Karsinomlar kanser vakalarının büyük çoğunluğunu oluşturur. Başta adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve bazal hücreli karsinom olmak üzere çeşitli alt sınıflara ayrılır. Adenokarsinom, epitel hücrelerin

oluşturduğu bezler veya glandüler benzeri yapılardan kaynaklanan kötü huylu bir neoplazmdir. Adenokarsinom meme, akciğer, prostat, kolon, rektum, pankreas, mide, özofagus gibi vücudun birçok bölgesinde ortaya çıkabilir gastrointestinal sistemdir. Adenokarsinomlar ayrıca kaynağı bilinmeyen kanserlerin yüzde 70'ini oluşturmaktadır (Mullangi, ve Lekkala). Skuamöz hücreli karsinom, en sık deri, akciğer, baş ve boyun, özofagus ve serviks olmak üzere birçok bölgede gelişmektedir. Skuamöz hücreli karsinom riski çocukluk ve gençlik döneminde kümülatif güneş maruz kalan bölgelerde daha fazladır (Combalia ve Carrera 2020; Choe vd 2021). Bazal hücreli karsinom ise derinin en alt tabakasındaki bazal hücrelerden kaynaklanır ve dünya çapında en sık görülen kanser sınıfıdır. Bazal hücreli karsinomlar genellikle yavaş büyürler ve nadiren diğer doku veya organlara metastaz yaparlar (Tanese 2019).

Sarkomalar kemik veya yumuşak dokulardan kaynaklanan nadir ve heterojen mezenkimal neoplazmlardır (Jeong vd 2023). Görülme sıklığı tüm malignitelerin %1'inden az olmasında rağmen farklı biyolojik davranışlara sahip 50'den fazla farklı alt tipe sahiptir. Sarkomların birçok alt tipinin olması ve nadir görülmeleri düşük tanılabilirlik ve sınırlı tedavi seçenekleri gibi sorunlar ortaya çıkarmaktadır (Miwa vd 2023).

Lösemi kemik iliğindeki kan hücrelerinden kaynaklanan kanserlerdir. Hastalığın ilerleme hızına ve etkilenen hücrelerin olgunluk derecesine göre akut ve kronik olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Akut lösemiler, hızlı ilerlemesi, olgunlaşmamış hematopoetik öncüllerin kemik iliğini istila etmesi ve çeşitli olgunlaşma basamaklarında farklılaşmanın durması ile karakterize bir grup malignitedir (Giles vd 2014; Alexander vd 2018). Kronik lösemide olgun beyaz kan hücrelerinin kontrolsüz çoğalması söz konusudur, yavaş ilerler ve uzun süre belirti göstermeyebilir. Ayrıca kronik lösemi lenfosit veya miyeloid hücrelerinden kaynaklanmalarına bağlı olarak sırasıyla kronik lenfositik lösemi ve kronik miyeloid lösemi olmak üzere sınıflandırılabilir (Fabbri vd 2016; Pasic ve Lipton 2017)

Lenfoma, lenfatik sistem elemanlarından T lenfosit, B lenfosit ve nadiren doğal öldürücü (Natural Killer) hücrelerinin klonal proliferasyonundan kaynaklanan farklı klinik, patolojik ve genetik özellik gösteren neoplazilerdir (Mugnaini ve Ghosh 2016). Hodgkin lenfoma ve Hodgkin-dışı (Non-Hodgkin) olmak üzere başlıca iki tür lenfoma bulunmaktadır. Hodgkin lenfoma (CHL), lenf nodlarında Reed-Sternberg hücreleri olarak adlandırılan büyük, anormal lenfositlerin görülmesi ile karakterizedir. Non-Hodgkin lenfoma (NHL) ise birçok alt türü olan ve daha yaygın görülen bir lenfoma türüdür (Montoto vd 2007; Swerdlow *et al* 2016; Jamil ve Mukkamalla 2021).

Merkezi sinir sistemi kanserleri beyin ve omurilikte meydana gelen kanserlerdir. MSS'nin en yaygın primer tümörleri glial tümörler olup malign beyin tümörlerinin % 80'ini oluşturur. Gliomalar glia veya nöroglia olarak adlandırılan sinir destek dokusunun neoplastik olarak değişimi sonucu oluşmaktadır. Ayrıca merkezi sinir sistemi kanserlerinin beyin ve omuriliği saran zarlar üzerinde gelişen meningiom, beyincikte gelişen medulloblastom, sinir hücrelerini kapsayan Schwann hücrelerinden kaynaklanan schwannom ve hipfiz bezine yakın lokasyonlarda orjinlenen kraniyofaringom gibi birçok alt tipi bulunmaktadır (Vidyarthi vd 2022).

Melanoma deride, iç kulakta, gözde ve merkezi sinir sisteminde bulunabilen ve pigment üreten hücreler olan melanositlerdeki genetik mutasyonlar sonucu oluşur. Melanoma tüm kötü huylu deri tümörlerinin yaklaşık %1'ini oluştursa da oldukça agresif ilerler ve mortalite oranı yüksektir (Domingues vd 2018).

Miyeloma kemik iliğinde bulunan ve monoklonal immunoglobulin üreten klonal plazma hücrelerinin anormal büyümesi ile karakterize edilen hematolojik bir malignitedir. Miyeloma yıkıcı kemik lezyonları, anemi, böbrek hasarı ve hiperkalsemi gibi çeşitli semptomlara yol açmaktadır. Hastalığın yatan karmaşık genomik düzensizlikler nedeniyle miyeloma hastalarının sağkalım sonuçları ve tedaviye yanıtları oldukça heterojen bir durum gösterir (Abe 2011; Dehghanifard vd 2018)

Kanser Hücrelerinin Ayırt Edici Özellikleri

Karsinogenez süresince tümör hücreleri sağlıklı hücrelerden ayrılabilen birçok farklı özellik kazanır. Bu özellikler; proliferatif sinyalleşmenin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, hücre ölümüne direnme, anjiyogenezin indüklenmesi ve metastazın aktivasyonudur (Hanahan ve Weinberg 2011; Fouad ve Aanei 20217; Reyna-Jeldes vd 2021; Senga ve Grose 2021).

Proliferatif Sinyalleşmenin Sürdürülmesi

Sağlıklı hücrelerde büyüme, çoğalma ve hemostazın sürdürülebilmesi büyümeyi indükleyen veya inhibe eden sinyaller yardımıyla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu sinyaller büyüme faktörleri adı verilen ve polipeptidler aracılığıyla taşınmaktadır. Büyüme faktörleri sıklıkla tirozin kinaz aktivitesine sahip büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak hücre içerisindeki sekonder habercileri uyarır ve birçok farklı hücre içi sinyal yolağını başlatabilir (Feitelson vd 2015). Sinyal molekülleri proto-onkogenler tarafından kodlanmaktadır. Proto-onkogenler (*Ras*, *Raf*, *MYC*, *CDK*, *ErbB* vb.), embriyogenez, yara iyileşmesi, büyüme-çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerde rol alan

proteinlerin sentezinde görev alırlar. Proto-onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını kontrol altında tutmak için çalışır ve gerektiği takdirde çoğalmayı engeller. Proto-onkogenler aşırı ifade edilmeleri veya yapılarında oluşan bozukluklar ile onkogene dönüşebilmektedir. Bu değişim kanserin en ayırt edici özelliklerinden olan çoğalma sinyalinin devamlılığına ve hücre büyümesi kontrolünün bozularak düzensiz hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (Pimentel 2020).

Diğer yandan kanser hücreleri büyüme faktörü ligandlarını kendileri üretilen hedef reseptörlerin ekspresyonunu arttırabilir ve bu durum otokrin proliferatif uyarıyla sonuçlanır. Ayrıca kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptör protein seviyesinin yükseltilmesiyle reseptör sinyalleme sürdürülebilir ve büyüme faktörü ligandının sınırlayıcı miktarına karşı daha duyarlı hale gelebilir. Kanser hücreleri büyüme faktöründen bağımsız olarak sinyal yolları bileşenlerinin aktivasyonu ile reseptör uyarılmasına ihtiyaç duyulmadan kontrolsüz çoğalma için uyarılabilir (Reyna-Jeldes vd 2021).

Büyüme Baskılayıcılarından Kaçınma

Kanser hücreleri proliferatif sinyaller tarafından uyarılma ve bu uyarının sürdürülmesi konusunda oldukça yetenekli olmalarının yanında hücre proliferasyonunu baskılayan mekanizmalardan da kaçabilmektedir. Normal hücrelerde hücre çoğalmasının kontrol altında tutulması ve gerekli durumlarda proliferasyonun durdurulması tümör baskılayıcı genlerin temel görevidir. Kanser hücrelerinde ise gelişen bazı mutasyonların sonucu olarak tümör baskılayıcı genler genellikle düşük ifade edilmekte ve/veya ifadesi tamamen kaybolmaktadır. Örneğin, *pRb*, *p53* ve *TGF-β* genleri önemli tümör baskılayıcı genler olup mutasyonları kanser gelişimi ve ilerlemesinde kritik öneme sahiptir. pRB hücre içi veya hücre dışı sinyalleri birleştirerek hücre döngüsünün G1 fazından S fazına ilerlemesini kontrol eder. Fosforile edilmemiş aktif haldeki pRB, E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanarak aktivitelerini inhibe eder. Bu inhibisyon ile hücrelerin anormal büyüme ve çoğalması engellenir (Di Fiore vd 2013; Dimaras vd 2015). p53 proteini ise stres veya anormallik durumlarında hücre döngüsünün ilerlemesini durdurabilir hatta hücrede onarılamaz bir hasar söz konusu ise apoptozu tetikleyebilir. Bu proteinlerin fonksiyonlarında kusur bulunan kanser hücreleri büyümeyi baskılayıcı sinyallerden kaçarak kontrolsüz ve hasarlı bir şekilde çoğalabilir (Nahta vd 2015; Hu vd 2021). Kanser hücrelerinde büyüme inhibisyonunun diğer bir önemli aracısı TGF-β sinyalidir. Normal şartlarda hücre döngüsünü durdurarak, apoptozu indükleyerek veya hücre farklılaşmasını düzenleyerek hücre büyümesi ve proliferasyonunu baskılar. Ancak kanser hücreleri TGF-β'inin inhibe edici fonksiyonlarından kaçış mekanizmaları geliştirebilirler. Bu hücreler TGF-β sinyalini atlatarak büyümeyi teşvik eden

alternatif sinyal yollarını (örneğin MAPK sinyal yolağı) aktive edebilirler. Ayrıca daha sonraki aşamalarda onkojenik mutasyonlarla tümör baskılayıcı gen işlevini kaybettiğinde TGF- β , tümör hücrelerini epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılan sürece girmeleri için uyararak bir tümör promotörü olarak işlev görür (Zhao vd 2018; Hao vd 2019).

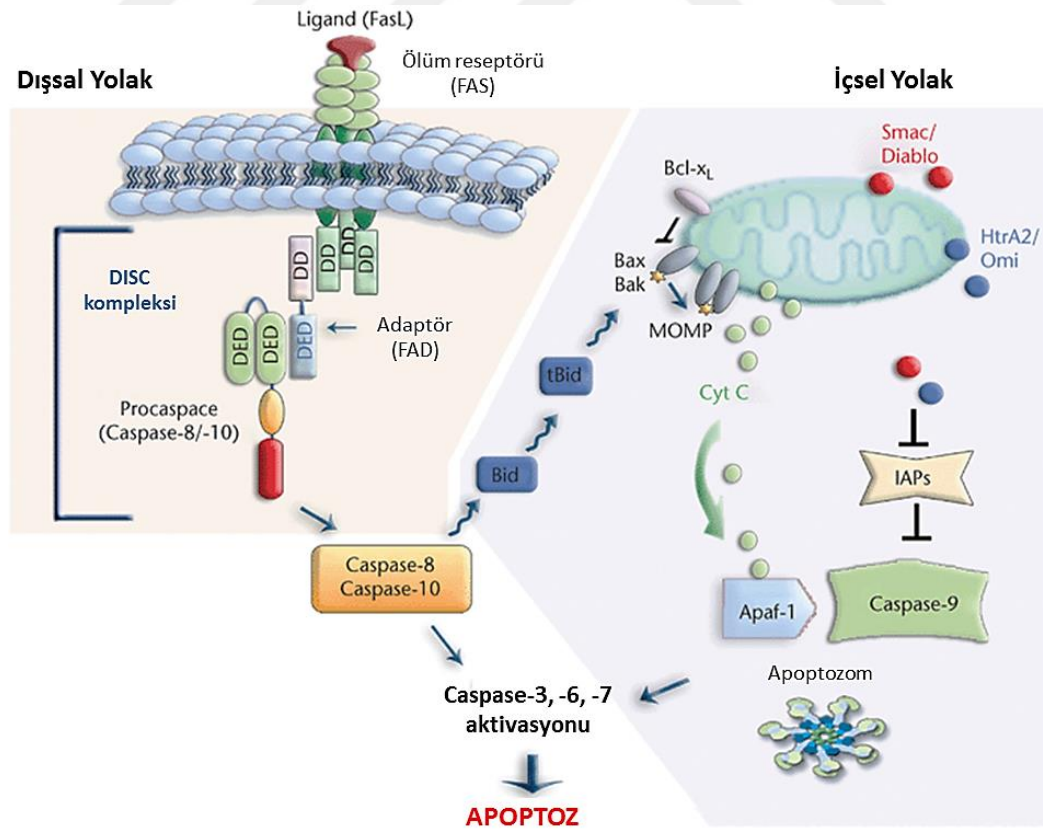
Hücrel Ölüm Direnc

Hücreler embriyonik gelişim sırasında morfogenezi desteklemek, fizyolojik olarak homeostaziyi sürdürmek, vücudu patojenlere karşı savunmak amacıyla düzenlenmiş hücre ölümü adı verilen süreçle kendi kendini yok eder. Bu süreç sayesinde anormal hücreler temizlenir. Düzenlenmiş hücre ölümü organizma gelişimi ve doku yenilenmesini kontrol eden sinyal yolları ile karakterize edilmektedir (D'arcy 2019; Newton vd 2024) .

Apoptoz, otofaji ve programlanmış nekroz morfolojik farklılıklarıyla kolayca ayırt edilebilen üç ana programlanmış hücre ölüm mekanizması olsa da yapılan çalışmalar ile piroptoz, ferroptoz ve kuproptoz gibi daha birçok alt tipi olduğu bilinmektedir (Ouyang vd 2012). Bazı durumlarda belirli bir uyarın bir tür düzenlenmiş hücre ölümünü indüklerken bazı durumlarda aynı uyarın birçok hücre ölüm sürecini tetikleyebilir. Bir hücre içerisinde farklı ölüm mekanizmaları bir araya gelerek karmaşık bir etkileşime girebilse de sonuç olarak bir mekanizma diğerlerine baskın olmaktadır (Su vd 2015).

Apoptoz, çeşitli uyarınlarla tetiklenen, genlerle düzenlenen, enerjiye ihtiyaç duyan ve programlı olarak hücrelerin yok edilmesiyle homeostazi sağlayan fizyolojik bir süreçtir. Apoptoz, embriyonik gelişim ve yaşlanma sırasında hücre popülasyonunun kontrol edilmesinde ve bağışıklık sistemi yanıtı olarak hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında anahtar bir rol oynar (Kashyap vd 2021). Kaspazlar apoptoz süresince hem başlatıcı hem de yürütücü olarak görev alırlar. Kaspazlar tarafından aktive edilen üç farklı apoptotik yol bulunmaktadır. Yaygın olarak tanımlanan iki yol intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptör) yoldur. Daha az bilinen üçüncü bir başlatma yolu ise intrinsik endoplazmik retikulum yoludur. Ekstrinsik yol hücre yüzeyinde bulunan Fas (CD95), tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNF-R) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörleri (TRAIL-R) gibi proapoptotik ölüm reseptörlerine uygun ligandların (FasL veya TNF- α gibi) bağlanmasıyla başlar (Kashyap vd 2021). Ligandların bağlanması ardından ölüm reseptörleri trimerize olarak hücre zarında toplanır. Bunu FADD ve TRADD gibi adaptör molekülleri ve prokaspaz-8 veya prokaspaz-10'u içeren hücre ölümünü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşması izler. Oluşan kompleks prokaspazları aktif kaspazlara dönüştürür. Bu dönüşüm kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin aktivasyonuna neden olur. Aktif hale gelen kaspazlar hücre iskeletinin yıkımına başlar (Pfeffer vd 2018, Carneiro vd 2020). İntinsik

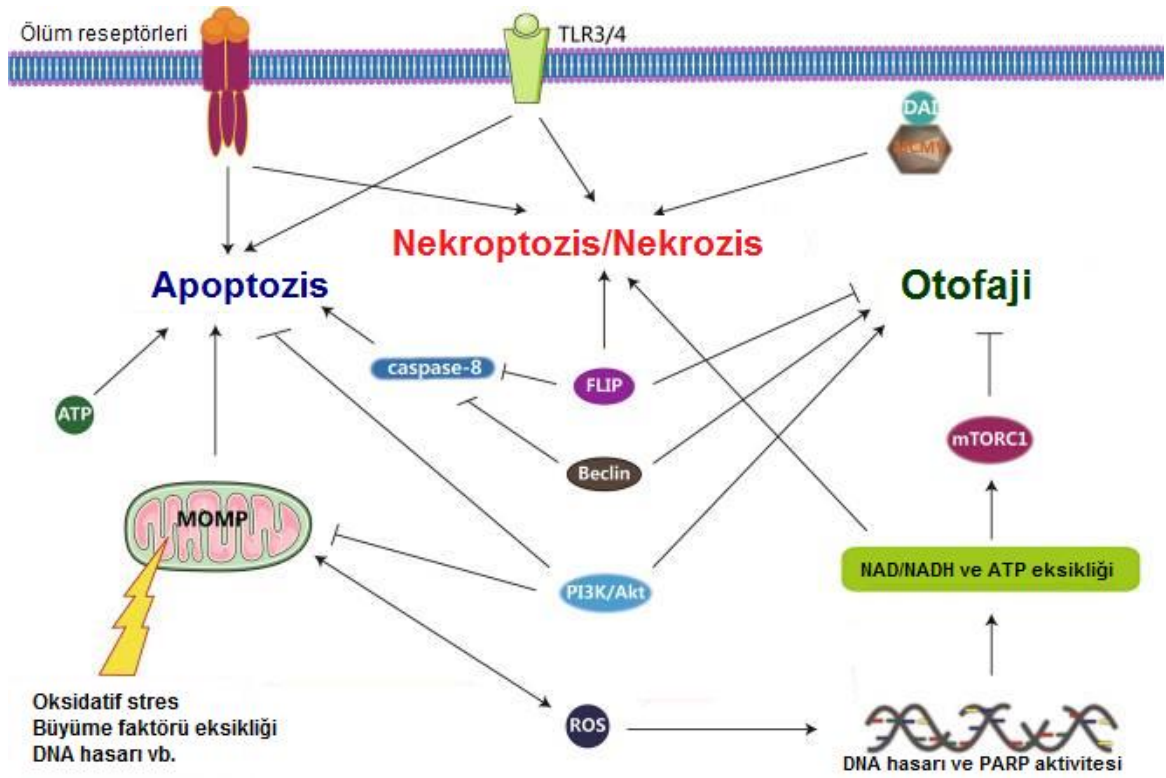
(mitokondriyal) yol dış uyarılara ek olarak DNA hasarı ve oksidatif stres gibi iç uyarılarla aktive edilebilir. Mitokondri membranı üzerinde bulunan BCL-2 protein ailesi intrinsik yolak için temel araçlardır. BCL-2 ailesi hem BCL-2, BCL-XL, MCL-1 gibi anti-apoptotik üyeleri hem de BAX, BAK, BID, BIM ve BH3-only gibi pro-apoptotik molekülleri içerir (Fulda vd 2010; Siddiqui vd 2015). Antiapoptotik proteinler tarafından mitokondri membranında bulunan BAX ve BAD proapoptotik proteinler inhibe edilir ve apoptoz engellenir. Proapoptotik proteinler ise mitokondri dış zarının geçirgenliğinin (mitochondrial outer membrane permeabilization-MOMP) artmasını sağlar ve apoptotik faktörler sitozole salınır. Mitokondriyal dış membranda eksprese edilen BAX ve BAK proteinleri apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) molekülüne bağlanır. Hücrede iç hasarın oluşmasıyla birlikte Apaf-1 serbest bırakılır. MOMP artışı ile birlikte mitokondride bulunan sitokrom C sitoplazmaya salınarak Apaf-1 ve kaspaz-9 moleküllerine bağlanır ve onları aktive ederek apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom kompleksinin oluşmasıyla birlikte kaspaz kaskadı başlatılır (Kashyap vd 2021). Mitokondrinin apoptozun intrinsik yolunda aldığı ana apoptotik sinyaller nükleer transkripsiyon faktörü p53 tarafından yönetilir. Çok sayıda anti-tümör yaklaşım, pro-apoptotik faktör ve tümör inhibitörü olması nedeniyle p53 ile ilişkili sinyal yollarını hedeflemektedir (Ouyang vd 2012).



Şekil 1. Apoptoz mekanizması (modifiye edilmiştir) (Cairrão ve Domingos 2010)

Nekroz, hücre şişmesi, plazma zarı yırtılması ve kromatin yoğunlaşması olmaksızın organel kaybı ile karakterize edilen bir hücre ölümüdür. Nekrotik hücre ölümü, toksin maruziyeti, yüksek sıcaklık, donma-çözünme, mekanik stres gibi hücre bütünlüğünün bozulacağı kadar büyük bir hasarın sonucu olarak ortaya çıkabilir (Green ve Llambi 2015). Reaktif oksijen türleri (ROS), Ca^{2+} , poli-ADP-riboz-polimeraz (PARP), kalsiyumla aktive edilen lizozomal olmayan proteazlar (kalpainler) ve katepsinler nekroza aracılık etmektedir. Nekrotik hücre ölümü her zaman tesadüfi veya pasif bir süreç değildir. Biriken kanıtlar, nekrozun indüklenebileceğini ve kaspazdan bağımsız bir şekilde olmasına rağmen apoptoz gibi düzenli bir şekilde ilerleyebileceğini göstermiştir. Düzenlenmiş nekroz, fiziksel travmanın neden olduğu nekroza ayırmak için "programlanmış nekroz" veya "nekroptoz" olarak adlandırılır (Su vd 2015; Gong vd 2019). Nekroptoz kaspaz enzimlerinin inhibe olduğu durumlarda aktive olur, RIPK1 ve RIPK3 protein kinazların etkileşimiyle indüklenir. Nekroptotik hücrelerin, dendritik hücreler için inflamatuvar uyaranlar sağlayarak adaptif immüneyi başlattığı, bunun da $CD8^+$ T hücrelerini ve anti-tümör immüneyesini aktive ettiği gösterilmiştir (Yatim vd 2015; Najafov vd 2017). Nekroptozun kanser üzerinde ikili etkileri bulunmaktadır. Nekroptozun bir yandan kanser ilerlemesini ve metastazı teşvik edebilen diğer yandan apoptoz tehlikeye girdiğinde tümör gelişimine karşı koruma sağlayan bir mekanizma olarak hizmet edebilen ikili etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Park vd 2009; Strlic vd 2016; Feng vd 2016; Gong vd 2019).

Otofaji, sitoplazmik proteinlerin ve mitokondri gibi organellerin veziküler birikimi ve degradasyonu ile karakterize edilen çok adımlı bir süreçtir (Fulda vd 2010). Otofajinin kanserde ikili rolü bulunmaktadır. Otofajinin tümör başlangıcını baskıladığı bilinmektedir. Ancak yerleşik tümörlerde otofaji süreçlerinin kontrolsüz hücre büyümesini ve artan metabolizma aktivitesini desteklediği de görülmüştür. Çünkü hücre içi makromoleküllerin bozulması, besinlerin az olduğu durumlarda minimal hücre işleyişi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır (Ouyang vd 2012). Otofajinin etkilerinin tümör evresine ve spesifik onkojenik mutasyonlara bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Mathew vd 2007).



Şekil 2. Programlanmış hücre ölüm mekanizmaları (modifiye edilmiştir) (Chen vd 2018).

Metastaz ve İnvazyon

Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrıldığı, primer tümör bölgesinden başka bir bölgeye yerleştiği ve büyüdüğü bir süreçtir (Guan 2015). Bu süreç morbidite ve mortalitenin birincil nedenidir ve kanser ölümlerinin yaklaşık %90'ından sorumludur. Kanser ölümlerinin çoğu birincil tümörden değil, kanser metastazından kaynaklanmaktadır. Radyoterapi veya kemoterapiye duyarlı tümörlerde bile metastaz sıklıkla tedavi başarısızlığının ana nedenidir (Guan 2015; Fares vd 2020).

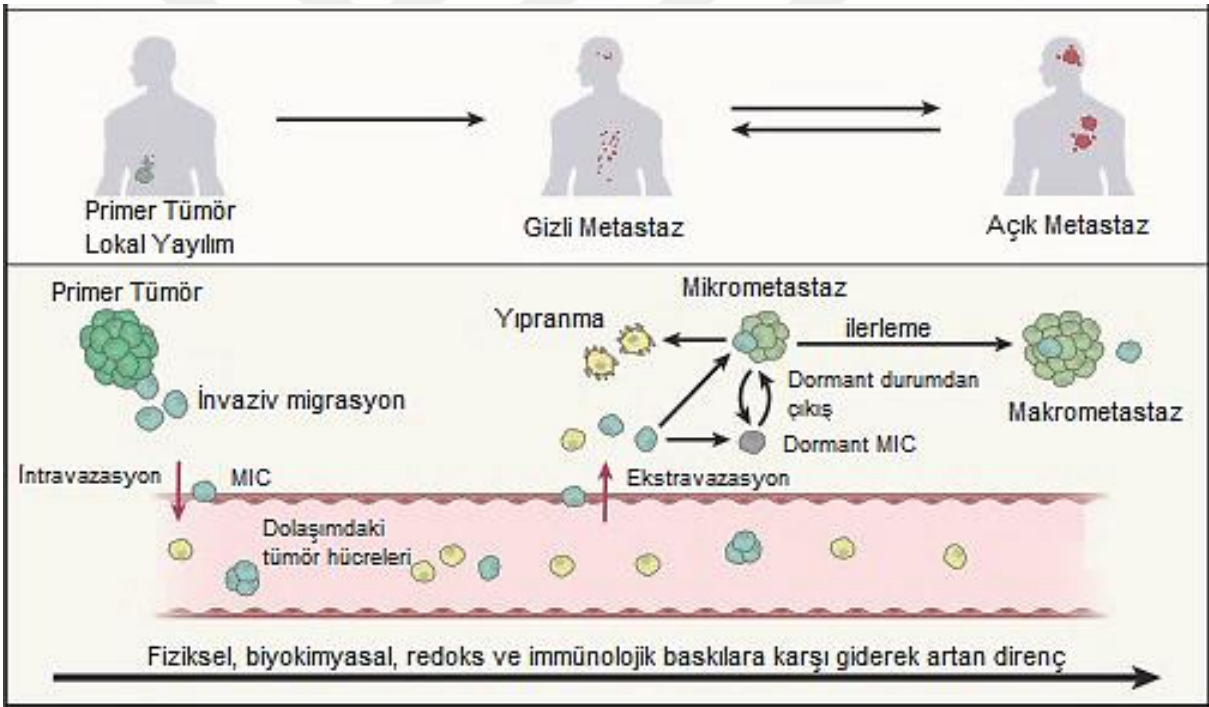
Metastaz dört temel adımdan oluşan komplike bir süreçtir:

- 1.adım (İnvazyon): Metastatik kaskadın ilk adımı invazyondur. Hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks (ECM) etkileşimlerindeki değişiklikler nedeniyle hücre hareketliliği artar (Su vd 2015). Tümör hücreleri bazal membrana nüfuz eder ve iki hareket tarzını (bireysel ve kolektif istila) kullanarak çevredeki dokuları istila eder (Novikov vd 2021).
- 2.adım: Tümör hücreleri birincil bölgeden uzaklaşır ve dolaşım sistemlerine göç ederler (intravazasyon).
- 3.adım: Malign hücreler dolaşım sistemleri boyunca ilerleyerek kapiller yatağa ulaşır, kanser hücreleri damar duvarına yapışır veya boyut kısıtlamaları nedeniyle bu bölgelerde tutulur.

4.adım (Ekstravazasyon): Bu adımda, kanser hücrelerinin hedef organlara girmek amacıyla damarlara nüfuz ettiği ekstravazasyon gerçekleşir. Bu adım kolonizasyonun görüldüğü yani metastatik hücrelerin çoğaldığı, mikrometastazlar veya makrometastaz oluşturduğu son adımdır (Su vd 2015). Ekstravazasyon süreci üç aşamadan oluşur:

- kan dolaşımı yoluyla taşınma,
- damar duvarına bitişik olarak durma
- endotelyal tek tabaka boyunca ikincil bölgeye geçiş

İstilacı tümör hücreleri hedef bölgeye giderken diğer protein ve hücrelerle iletişime girer. Tümör mikro ortamıyla iletişim, istilacı kanser hücrelerinin stromal zorlukların üstesinden gelmesine, yerleşmesine ve kolonileşmesine olanak tanır. Kanser hücrelerinin bu özellikleri, tümör hücresinin kendisinde ve mikro ortamındaki genetik ve epigenetik modifikasyonlar tarafından yönlendirilir (Fares vd 2020).

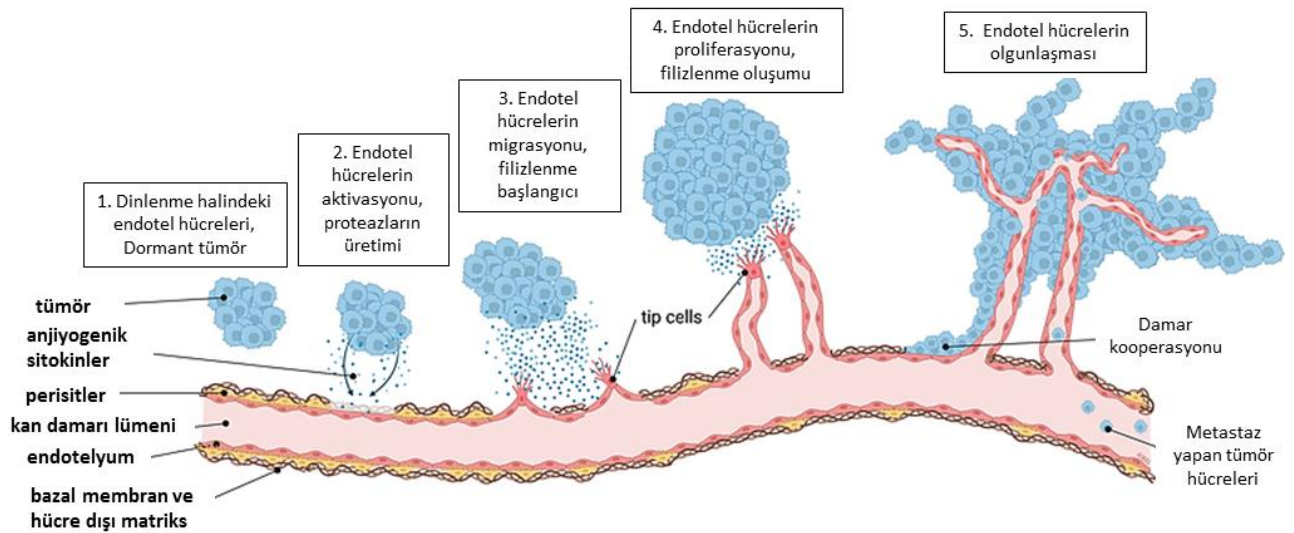


Şekil 3. Metastaz sürecinin aşamaları (modifiye edilmiştir) (Gerstberger vd 2023)

Anjiyogenez

Anjiyogenez, yeni kan damarlarının mevcut fonksiyonel damar ağından oluştuğu, belirli biyomoleküller tarafından kontrol edilen normal ve çok adımlı bir süreçtir. (Rajabi vd 2017; La Mendola vd 2022). Fizyolojik anjiyogenez süreçleri embriyo gelişimi, yara iyileşmesi, menstrual döngü, doku onarımı, kas büyümesi ve gelişmiş organ perfüzyonu için çok önemli olup pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler tarafından dengeli bir şekilde

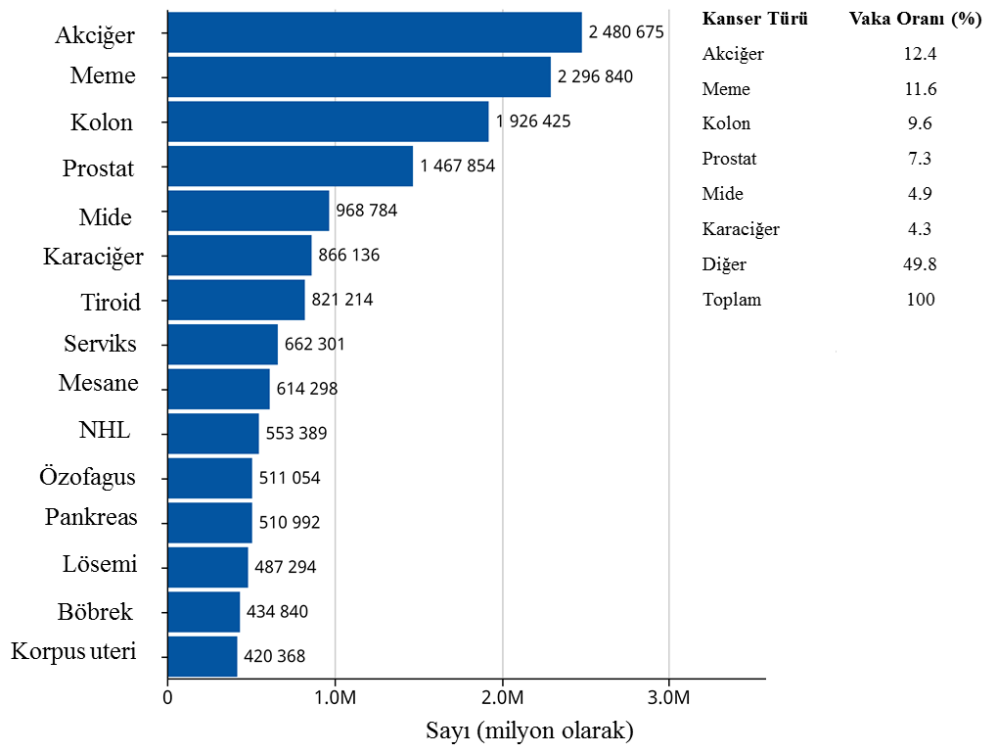
yönetilir. Malignitede bu denge bozulur ve tümör gelişiminin erken - orta evrelerinde proanjiyogenik duruma doğru kayarak yeni damar yapısının oluşumuna yol açar (Yang vd 2013; Rajabi vd 2017; Liu vd 2023). Tümör büyümesi ve metastazı kimyasal sinyallerle tetiklenen anjiyogeneze bağlıdır. Kan dolaşımı olmayan kanser hücrelerinin çapı 1-2 mm³'e kadar büyüdüğü ve sonra durduğu, ancak anjiyogenezin mümkün olduğu bir alana yerleştirildiğinde 2 mm³'ün üzerine çıktığı görülmüştür (Holmgren vd 1995; Parangi vd 1996). Tümörde hipoksi, iskemi, asidoz ve yüksek interstisyel basıncın olduğu bir mikro ortam gelişir; bu ortam ise çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin salgılar. Ardından tümör besin ve oksijen ihtiyacını karşılamak için anjiyogeneze uyarılır (Liu vd 2023). Vasküler desteğin yokluğunda tümörler nekrotik ve apoptotik hale gelebilir (Nishida vd 2006). Anjiyogeneze tümör kan damarlarından uzak bölgelerde daha şiddetli hipoksi, asidoz ve yüksek interstisyel basıncın olduğu bir mikro ortam oluşturarak kanser patogenezini destekler (Liu vd 2023). Anjiyogeneze, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) gibi büyüme faktörleri, integrin ve kadherin gibi adezyon faktörleri, matriks metaloproteinaz gibi çeşitli proteazlar, fibronektin ve kollajen hücre dışı matriks proteinleri, interlökinler (IL), hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF), mTOR, AKT, nitrik oksit (NO), anjiyopietin gibi kritik birçok biyomolekül tarafından düzenlenir. Bu biyomoleküller endotel hücrelerinin proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve anjiyogenezi indüklemek için transmembran reseptörleri aracılığıyla sinyal yolu transdüksiyonunu başlatır (Liu vd 2023).



Şekil 4. Anjiyogeneze sürecinin aşamaları (modifiye edilmiştir) (Hermans vd 2023)

Kanser Prevalansı

Kanser, yüksek, sosyal, psikolojik, ekonomik ve klinik yüke sebep olan ve dünyada insidansı artmaya devam eden önemli toplumsal sorunlardandır. Dünyada bilinen ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sırada kanser yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) bağlı bir kuruluş olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) 2022 yılında yayınladığı GLOBOCAN verilerine göre küresel kanser yükünün yaklaşık olarak 19,6 milyon yeni vakaya ve 10 milyona yakın can kaybına yükseldiği bildirilmiştir. Yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak görülme sıklığı en fazla olan kanser türü akciğer kanseri (% 12,4) olup, bunu meme (% 11,6) ve kolon kanseri (% 9,6) izlemektedir.



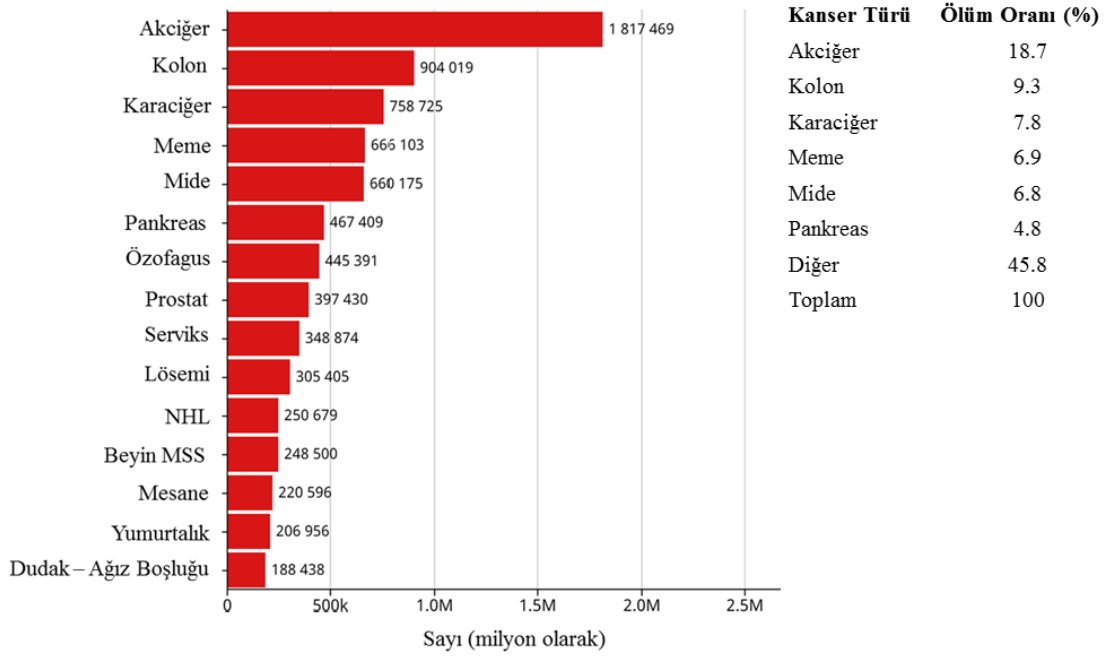
Şekil 5. Dünya genelinde 2022 yılında kanser türlerinin vaka sayısı ve oranları (GLOBOCAN 2022 (version 1.1) - 08.02.2024) (modifiye edilmiştir)

Yine Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 15-49 yaş aralığında meme kanseri (% 21,2) en sık görülen tür olup, bunu tiroid (% 13,1) ve serviks (% 8,1) kanserleri takip etmektedir. 50-59 yaş aralığında ise, en sık meme kanseri (%15,6) görülürken bunu akciğer (% 11,7) ve kolon (% 9) kanserleri izlemektedir. 60 yaş ve üstünde en sık görülen maligniteler akciğer (% 14,8), kolon (% 10,9), prostat (% 10) ve meme (% 8,2) kanserleri olarak bildirilmektedir.

Tablo 1. Dünya Genelinde 2022 Yılında Yaşlara Göre Kansere Türlerinin Vaka Sayı ve Oranları (Cinsiyetten Bağımsız) (GLOBOCAN 2022 (version 1.1) - 08.02.2024) (modifiye edilmiştir)

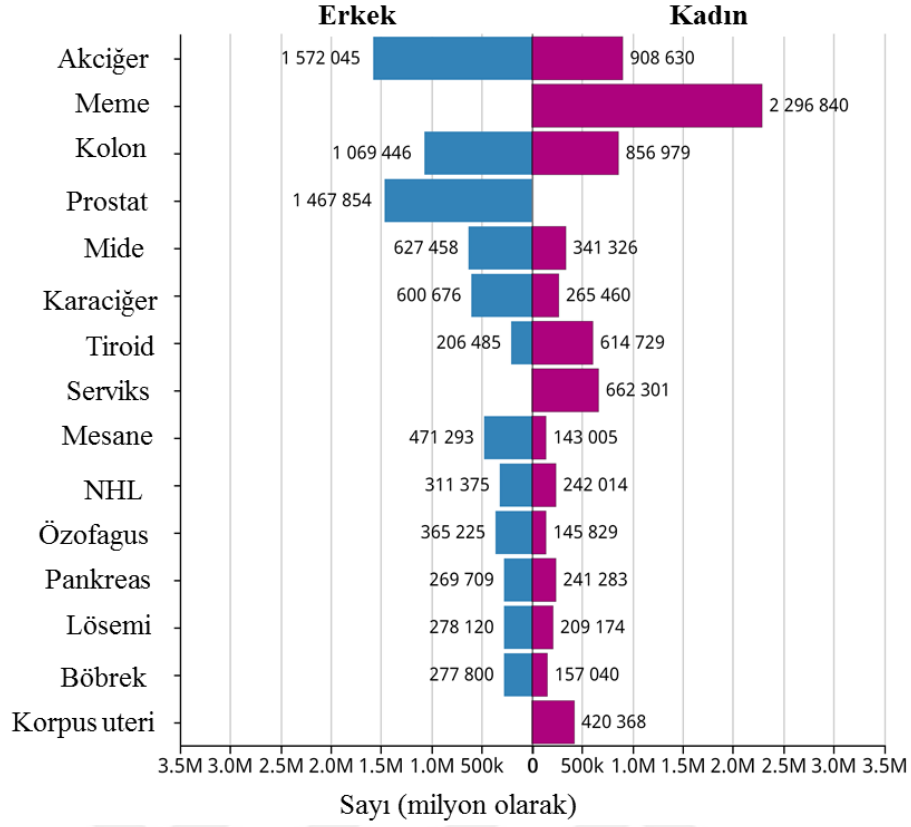
Yaş Aralığı	Kanser Türü	Vaka Sayısı	Vaka Oranı (%)
15-49 yaş arası	Meme	669 414	% 21,2
	Tiroid	412 631	% 13,1
	Serviks	254 589	% 8,1
	Kolon	186 622	% 5,9
	Akciğer	137 653	% 4,4
	Karaciğer	108 416	% 3,4
	Diğer	1 383 332	% 43,9
50-59 yaş arası	Meme	571 923	% 15,6
	Akciğer	431 079	% 11,7
	Kolon	331 099	% 9
	Tiroid	214 133	% 5,8
	Karaciğer	186 547	% 5,1
	Serviks	180 785	% 4,9
	Diğer	1 754 913	% 47,8
60 yaş ve üstü	Akciğer	1 910 849	% 14,8
	Kolon	1 407 328	% 10,9
	Prostat	1 290 931	% 10
	Meme	1 067 354	% 8,2
	Mide	727 828	% 5,6
	Karaciğer	565 676	% 4,4
	Diğer	5 971 111	% 46,1

Akciğer kanseri 2022 yılında kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen nedenidir ve toplam kansere bağlı ölümlerin % 18,7'sini kapsamaktadır. Bunu kolon kanseri (% 9,3) ve karaciğer kanseri (% 7,3) takip etmektedir. Ülkemizin Sağlık Bakanlığı'nın 2017 kanser verileri ile 2022 GLOBOCAN verileri karşılaştırıldığında Türkiye kanser insidansının dünya insidansının az da olsa üzerinde seyrettiği görülmüştür (Ferlay vd 2021).



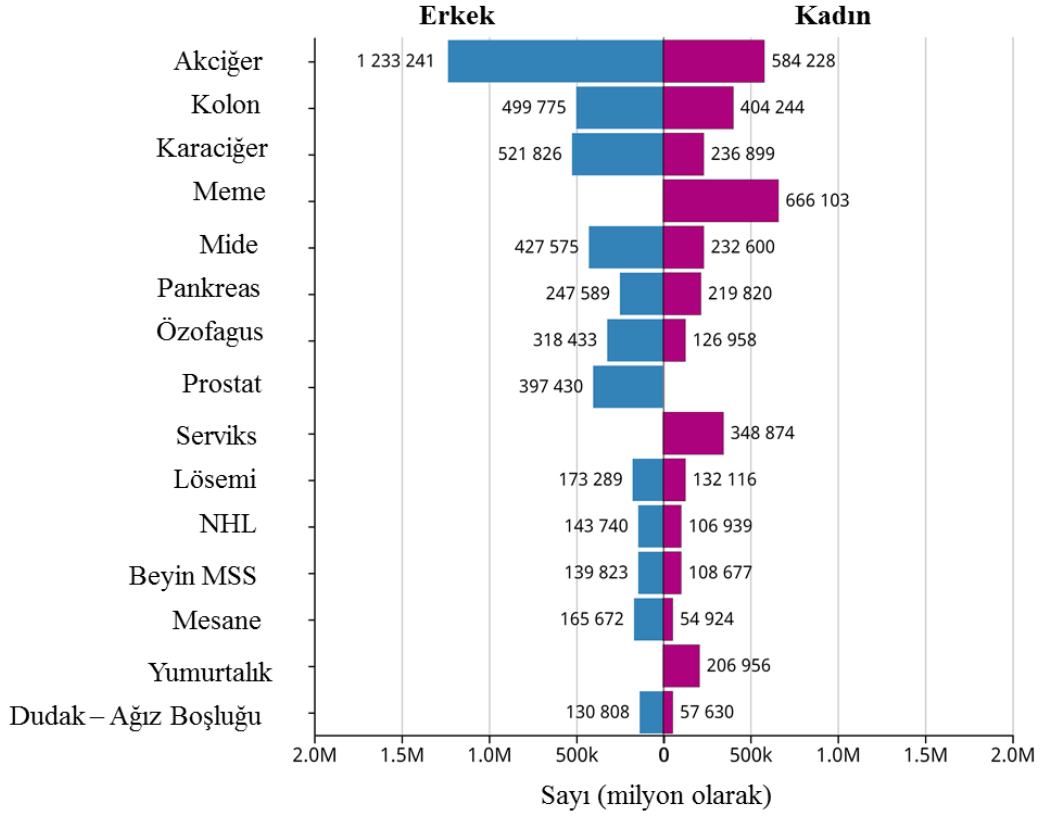
Şekil 6. Dünya genelinde 2022 yılında kanser nedeni ölümlerin sayısı ve oranları (GLOBOCAN 2022 (version 1.1) - 08.02.2024) (modifiye edilmiştir)

Dünya genelinde kanser türlerinin görülme oranları cinsiyetler arasında da oldukça önemli farklılıklar göstermektedir. Kadınlarda en yaygın %24,5 insidans oranı ve 2,26 milyon vaka sayısı ile meme kanseridir. Meme kanserini sırasıyla 908 630 ve 856 979 vaka sayıları ile akciğer ve kolon kanseri takip etmektedir. Erkeklerde ise en yaygın kanser türü %14,3 insidans oranı ve 1 572 045 vaka sayısı ile akciğer kanseridir. Bunu 1 467 854 vaka sayısı ile prostat ve 1 069 446 vaka sayısı ile kolon kanseri takip etmektedir. Ayrıca mide ve karaciğer kanserleri de erkeklerde sıklıkla görülen kanser türleri arasında yer almaktadır (GLOBOCAN 2022)



Şekil 7. Dünya genelinde 2022 yılında kanser türlerinin kadın ve erkeklerdeki görülme sayı ve oranları (GLOBOCAN 2022 (version 1.1) - 08.02.2024) (modifiye edilmiştir)

Kanser nedenli ölüm oranları da yine cinsiyetler arasında belirgin derecede farklıdır. Kadınlarda en yaygın %15,5 ölüm oranı ve 666 103 can kaybı ile meme kanseri ilk sırayı almaktadır. Akciğer kanseri %13,7 ölüm oranıyla 584 228, kolon kanseri %9,4 ölüm oranıyla 404 244 ve %7,2 ölüm oranıyla 348.874 can kaybına neden olmuştur. Erkeklerde ise akciğer kanseri %21,8 oranıyla en yüksek ölüm oranına sahip olarak 1 233 241 can kaybına neden olmuştur. Bunu %11 ölüm oranı ve 521.826 ölüm sayısı ile karaciğer kanseri, %9,5 ölüm oranı ve 472 575 ölüm sayısı ile mide kanseri, %9,4 ölüm oranı ve 499 775 ölüm sayısı ile kolon kanseri takip etmektedir (GLOBOCAN 2022).



Şekil 8. Dünya genelinde 2022 yılında kadın ve erkeklerdeki kanser nedenli ölümlerin sayı ve oranları (GLOBOCAN 2022 (version 1.1) - 08.02.2024) (modifiye edilmiştir)

Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri dünya genelinde yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Bu kanser türünün liste başında yer almasının nedeni kanser ileri evreye gelmeden teşhis edilmesinin zor olmasıdır (Nooreldeen vd 2021). Ancak iki cinsiyet arasındaki insidans ve mortalite oranları farklıdır. Akciğer kanseri kadınlarda sık görülen ikinci kanser türüyken yine kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Erkeklerde ise akciğer kanseri en sık görülen kanser türüyken kansere bağlı ölümlerin ilk nedenidir (Nair vd 2020).

Akciğer kanserinde solunum yollarını kaplayan normal hücrelerin veya mukoza bezlerinin kansere dönüşümü hiperplazi denilen durum ile başlamaktadır. Hiperplazi solunum yollarını bir kısmını kaplayan hücre sayısının artmasıyla karakterize olan bir durumdur. Ardından hücrelerin yapısı, büyüklüğü, şekli ve organizasyonunda anormal değişikliklerin görüldüğü genellikle bir tür prekanseröz durum olarak kabul edilen ve kansere dönüşme riski olan displazi gelişir. Tedavi edilmediği durumlarda hücreler büyümeye devam ederek invazyon ve metastaz görülebilir (Sutherland ve Berns 2010).

Akciğer kanseri, histolojik olarak kanserin başladığı hücre tipine göre küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere ikiye

ayrılır. Akciğer kanserinin küçük hücreli olup olmadığı mikroskop incelemesi sonucu gözlenen şekil ve boyut gibi morfolojik özelliklere göre belirlenmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) en yaygın akciğer kanseri türüdür ve tüm akciğer kanseri teşhislerinin %80-85'ini oluşturmaktadır.

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri hastalarının yaklaşık olarak %85'inde histolojik alt tip olarak Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) görülmektedir (Herbst vd 2018). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri histolojik olarak adenokarsinomlar, skuamöz hücreli karsinomlar ve büyük hücreli karsinomlar olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Sutherland ve Berns 2010; Yu ve Li 2020; Wang vd 2023).

Adenokarsinom: Akciğer kanserinin %30'un fazlasını adenokarsinomlar oluşturmaktadır. Adenokarsinomlar genellikle akciğerlerin dış kenarlarında bulunan mukus üreten küçük bezlerin hücrelerinde başlamaktadır. Sıklıkla sigara kullanmayan orta yaşlı kadınlarda görülmektedir. Adenokarsinomlar preinvazif lezyonlardan, kötü prognozlu invazif adenokarsinom formlarına uzanan bir spektrum oluşturmaktadır. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği/Amerikan Toraks Derneği/Avrupa Respiratuar Hastalıklar Derneği (IASLC/ATS/ERS) 2011 yılında akciğer adenokarsinomunu preinvazif lezyonlar, minimal invazif adenokarsinom, invazif karsinom ve invazif adenokarsinom varyantları olmak üzere kategorilere ayırmıştır. Tümör histopatolojik olarak oldukça heterojen bir yapıya sahiptir. Akciğer adenokarsinomu lepidik, papiller, asiner veya müsin üreten solid olmak üzere çeşitli alt tiplere ayrılır. Bu patolojik alt tiplerin histolojik özellikleri, görüntülemeadaki büyüme paternleri, tümör genetiği ve evreleme bakımından iyi anlaşılması verimli tanı ve tedavi için oldukça önemlidir (Travis vd 2011; Hutchinson vd 2019)

Skuamöz hücreli karsinom: Epidermoid karsinom olarak da bilinmektedir. Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %25-30'u skuamöz hücreli karsinomlar oluşturur ve sigara içme öyküsüyle ilişkilidir. Skuamöz hücreli karsinom sıklıkla akciğerin orta bölümünde yer alır ve diğer akciğer kanseri türlerine göre nispeten yavaş bölünür. Skuamöz hücreli karsinomların %90'ından fazlasında ise tümör baskılayıcı genler olan *TP53* ve *CDKN2A* genlerinin mutasyona uğradığı görülmektedir (Herbst vd 2018).

Büyük hücreli karsinom: Akciğerin herhangi bir yerinde ortaya çıkabilen ve hızla büyüme eğiliminde olan KHDAK karsinomudur. Akciğer kanseri vakalarının en nadir görülenidir ancak çok hızlı bir şekilde büyüme ve yayılma göstermesiyle birlikte metastaz

yapana kadar farkedilmediklerinden tedavi oranı düşüktür (Rodriguez-Canales vd 2016; Tai vd 2020).

Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) bazal bronşiyal epiteldeki nöroendokrin hücrelerden kaynaklanmaktadır. KHAK hücreleri mikroskop altında incelendiğinde, küçük boyutlu, iğ veya yuvarlak şekilli, az sitoplazmalı ve granüler kromatinli olarak tanımlanmakta olup nekroz görülmesi oldukça yaygın bir bulgudur. KHAK, başta beyin olmak üzere, kemiğe, böbrek üstü bezlere ve karaciğere metastaz yapabilmesi ile karakterize edilen bir kanser türüdür. KHAK akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %15'ini oluşturur ve tütünle en güçlü epidemiyolojik bağlantısı olan kanserler arasındadır. KHAK vakalarının büyük çoğunluğunda p53 ve RB olmak üzere iki kritik tümör baskılayıcının eşzamanlı inaktivasyonu söz konusudur. KHAK, küçük hücreli dışı akciğer kanserine (KHDAK) göre radyoterapi ve kemoterapiye daha duyarlı olsa da prognozu son derece kötüdür ve teşhis konulmadan önce metastaz yapma oranı da yüksektir (Bernhardt vd 2016; Rudin vd 2021)

Akciğer Kanserinin Etiyolojisi

Akciğer kanserinin en yaygın etiolojisi sigara ve diğer tütün ürünlerinin kullanımınıdır. 2.Dünya Savaşı sırasında ve sonrasında sigara ve tütün ürünlerinin kullanımının artması ile birlikte akciğer kanserinin görülme sıklığı da artmıştır. Sigara ve tütün kullanımı akciğer kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık olarak % 85'inden fazlasını oluşturmaktadır. Bu kanser türü için diğer bir risk faktörü pasif içiciliktir ve hiç sigara kullanmamış bireylere göre akciğer kanseri riskini % 25 artırmaktadır (Hori vd 2016). Akciğer kanserine neden ve en sık görülen mesleki risk faktörü ise asbesttir. Küçük parçalara ayrılabilen bir mineral bileşiği olan asbest, havadaki liflerine maruz kalan kişilerde akciğer kanseri riskini arttıran bir kanserojendir. Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %3 ile %4'ünün asbest maruziyetinden kaynaklandığı bilinmektedir. Diğer olası risk faktörlerine tekrarlayan akciğer iltihabı, HIV, aile öyküsü, astım, pnömoni ve tüberküloz geçmişi, radon gazı, krom, nikel ve arsenik gibi kanserojenlere maruz kalma örnek olarak verilebilir (Ettinger vd 2010).

Akciğer Kanseri Evrelemesi ve Tedavi Yöntemleri

Akciğer kanseri hücresel ve histolojik düzeyde oldukça heterojen bir kanser türü olduğundan bu durum prognozunu belirlemesini ve tedavi yönteminin seçimini zorlaştırmaktadır (de Sousa ve Carvalho 2018). Akciğer kanseri belirti veya semptomlarıyla doktora başvuran hastaların genellikle ileri evre kanser hastası olduğu görülmüştür. Öksürük, hemoptizi (kanlı tükürme), dispne (solunum zorluğu) ve göğüs ağrısı akciğer kanserinin en

sık görülen belirtileridir. Akciğer kanseri evrelemesi hastalığın yayılımının ve prognozunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir süreç olup tedavi planının oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır. Farklı tedavi planları oluşturmak için akciğer kanserini doğru şekilde evrelemek oldukça önemlidir. Akciğer kanseri evrelemesinde göğüs röntgeni (X-ray), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve pozitron emisyon tomografisi ile birlikte bilgisayarlı tomografi taraması (PET-CT)) başta olmak üzere çeşitli görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Ayrıca evrelemede biyopsi, kan testleri, moleküler testler ve endobronşiyal ultrason (EBUS) gibi farklı tanı yöntemlerine de başvurulmaktadır (Jones vd 2018; Nasim vd 2019; Gregor vd 2020).

Akciğer kanseri evreleri, Akciğer Kanseri Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) tarafından formüle edilmiş olan TNM evreleme sistemine göre değerlendirilmektedir. TNM evreleme sistemi, primer tümör boyutunu (T), tümörün lenf düğümlerine metastazını (N0-N3) ve metastaz varlığını (M1/M0) kullanarak kanserin evresini belirlemeyi amaçlamaktadır. KHDAK üzerinde yapılan çalışmalarda T evrelemesinin artması ile sağkalımın azaldığı görülmüştür (Sica vd 2012).

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin evre I (alt grupları; evre IA1, evre IA2, evre IA3, evre IB), evre II (alt grupları; evre IIA, evre IIB), evre III (alt grupları; evre IIIA, evre IIIB, evre IIIC) ve evre IV (alt grupları; evre IVA ve evre IVB) olmak üzere dört evresi vardır. İlk evre kanserin akciğer içinde oluşumudur. En yakın lenf bezlerine yayılması ile ikinci evre, sağ ve sol akciğer arasındaki boşluk ve akciğer zarına yayılmışsa üçüncü evre, kemik, karaciğer ve/veya böbrek üstü bezlerine yayılmışsa dördüncü evre olarak adlandırılır. Birinci evrede tedavinin başarı oranı oldukça yüksek olup cerrahi müdahale ile akciğerde bulunan tümör temizlenebilir. Diğer evrelerde ise hastalığın durumuna göre kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel yöntemler uygulanmaktadır (Liam vd 2015; Woodard vd 2016).

Küçük hücreli akciğer kanseri ise genellikle sınırlı ve geniş evre olmak üzere iki ana evrede sınıflandırılır. Sınırlı evrede kanser sadece bir akciğerin bir kısmı ve yine aynı tarafta bulunan lenf düğümlerinde bulunur. Sınırlı evreye genellikle kemoterapi veya radyoterapi kombinasyonu ile müdahale edilmektedir. Geniş evrede ise kanser başlangıç bölgesinden farklı alanlara, diğer akciğere, plevraya (akciğer zarına), karaciğere, dalağa, beyne, kemiklere veya diğer organlara yayılmıştır. Bu evrede başlıca tedavi yöntemi kemoterapidir (Van Meerbeeck vd 2011; Rudin vd 2021).

Hepatoselüler Karsinom

Karaciğer kanseri dünyada en sık görülen altıncı kanser türü olup kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedenidir. Erkeklerin karaciğer kanserine yakalanma riski kadınlara göre daha yüksektir ve bu oran yaklaşık olarak 2,8:1'dir. Karaciğer kanseri kadınları etkileyen en yaygın altıncı kanser olmasına rağmen, kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir Erkeklerde ise karaciğer kanseri en yaygın beşinci kanser türü olup kansere kaynaklı ölümlerin üçüncü önde gelen nedenidir (Kulik ve El-Serag 2019; Chidambaranathan-Reghupaty vd 2021).

Karaciğer dokusunu başlıca hepatositler, Kupffer hücreleri, hepatik stellat hücreleri ve endotel hücreleri oluşturmakta olup ek olarak kas hücreleri, sinir hücreleri, fibroblastlar, fibrinojen, kollajen, fibronektin gibi ekstraselüler matriks elemanları ve inflamatuvar hücreleri de içermektedir. Ayrıca (hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörünü ve çeşitli proteazlar bulunmaktadır. Hepatositlerin rejenerasyon yeteneği sayesinde karaciğerde bir hasar meydana gelse dahi onarılabilir. Karaciğerde onarılamayan hasar oluşması durumunda fibrogeniz ve fibrolitik arasındaki denge bozulur ve sirozla sonuçlanabilen anormal derecede fibroz artışı gerçekleşir. Kollajen, fibronektin, fibrinojen gibi ECM proteinleri birikmesi nedeniyle hepatositlere yeterli besin ve oksijen gidemez. Nekroz süreci başlar ve ECM proteinleri de giderek artar. Hepatositlerin nekroz sonucunda ölmesiyle sessiz durumda olan hepatik stellat hücreleri aktifleşir ve miyofibroblastlara dönüşürler. Miyofibroblastlar ortama ECM proteinleri, büyüme faktörleri ve sitokinler salarlar. Bu süreçte makrofajlar gibi savunmada ve doku hasarı tamirinde görev alan Kupffer hücreleri de sitokin ve büyüme faktörleri salarak hem stellat hücrelerin hem de mezenşimal hücrelerin aktivasyonunu teşvik eder. Sonuç olarak karaciğer mikroçevresi değişmesiyle birlikte siroz oluşumu ve ilerleyen evrelerde hepatoselüler karsinom (HCC) görülür (Baran 2013).

Karaciğer tümörleri primer benign, primer malign ve sekonder malign (metastatik) olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Primer ve sekonder malign karaciğer tümörleri asemptomiktir, karaciğerde başlayıp tüm vücuda yayılım gösterir (Zhou vd 2013). Karaciğer kanserinin histolojik olarak çeşitli alt tipleri bulunmaktadır. Bu kanser tiplerinin en yaygın görülen iki primer malignite hepatoselüler karsinom (HCC) ve kolanjiyokarsinom (CCA) olmak üzere daha az sıklıkta görülen türler ise hemanjiyosarkom, anjiyosarkom ve hepatoblastomadır (Chidambaranathan-Reghupaty vd 2021). HCC oldukça heterojen bir yapıya sahip olması nedeniyle en dirençli ve malign kanserlerden biri olarak dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen sebebidir (Brown vd 2023).

Hepatoselüler Karsinom Etiyolojisi

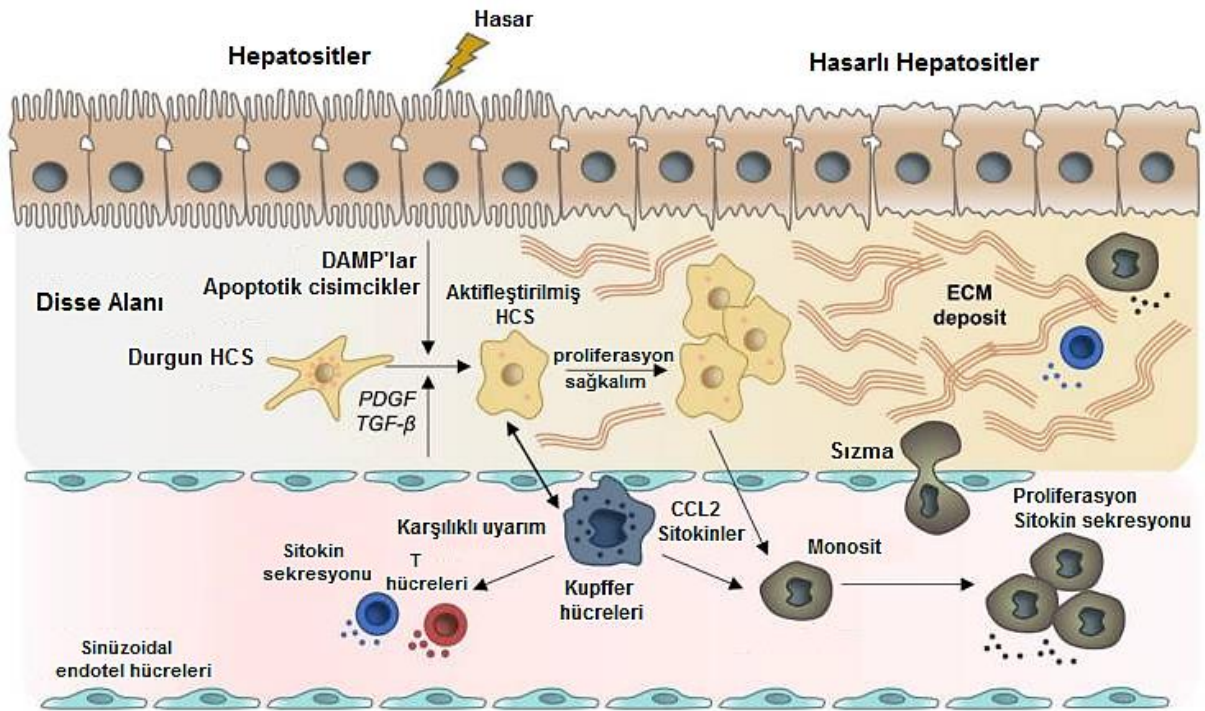
Hepatoselüler karsinom (HCC) karaciğer kanserleri arasında en sık görülen neoplazmdir vakaların %90'ını oluşturur (Forner vd 2018). Hepatit B virüsü (HBV) ve Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), obezite, aşırı alkol alımı, aflatoksin maruz kalma, nadir genetik bozukluklar (örneğin; Wilson hastalığı ve hemokromatoz), çeşitli genetik varyasyonlar HCC ile ilişkili etiyolojik faktörlerdendir (Baffy vd 2012, Nasereldin vd 2022).

Kan ve diğer vücut sıvıları yoluyla bulaşabilen ve dünya genelinde en sık görülen enfeksiyonlardan olan hepatit B ve C virüsünün neden olduğu kronik hepatit, hepatoselüler karsinomun (HCC) önde gelen nedenlerindedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yaklaşık 257 milyon kişinin HBV enfeksiyonu ile yaklaşık 71 milyon kişinin ise HCV enfeksiyonu ile yaşadığını öngörmektedir. Örneğin 2018 yılında dünya çapındaki HCC vakalarının %54,5'inin HBV, %21,2'sinin ise HCV enfeksiyonu nedeni olduğu görülmüştür (Chidambaranathan-Reghupaty vd 2021).

Aflatoksinler *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* gibi mantar türleri tarafından üretilen, doğada yaygın olarak bulunan, akut veya kronik zehirlenmeye neden olan hepatotoksinlerdir. Bu bileşiklerin en toksin olanı Aflatoksin B1 (AFB1) olup HCC gelişimine yol açtığı karakterize edilmiş mutajenisite, teratojenisite, karsinojenisite gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Cao vd 2022). İnsanlar bu toksinlere pirinç, fıstık, mısır gibi yiyeceklerle beslenen hayvanların ürünlerini tüketmekle maruz kalmaktadır. Aflatoksin maruziyetinin olduğu endemik bölgelerde HCC'de p53 geninde özgün bir mutasyon saptanmıştır (Chidambaranathan-Reghupaty vd 2021).

HCC'ye neden olan diğer bir faktör olan alkol kullanımı hastalığın yaklaşık %15-30'undan sorumludur. Kronik alkol kullanımı steatoz, steatohepatit ve siroz gibi patolojik olayları tetikleyerek kanser sürecinin başlamasına neden olabilir (Taniai 2020). Alkol alımı ile birlikte hepatosit mikrozomal sitokrom P450 2E1'in indüklenmesi ve etanolün alkol dehidrojenaz yardımıyla metabolize edilmesi, serbest radikallerin ve asetaldehitin oluşumuna neden olur. Bu reaktif bileşikler DNA ve sinyal yollarının kritik bileşenleri dâhil birçok hücrel hedefe bağlanır. Asetaldehit doğrudan DNA hasarına yol açabilir ve aynı zamanda detoksifikasyonda kilit bir antioksidan olan glutatyonu tüketebilir. Bu etkenlere ek olarak aşırı alkol alımı, bağışıklık sisteminde değişikliklere, kronik inflamasyonun tetiklenmesine ve gen ifadesindeki değişikliklere yol açarak kanserleşme sürecine katkıda bulunur. (McKillop vd 2005; Grewal vd 2012; Taniai 2020).

İlerlemiş karaciğer fibrozu ve siroz hepatoselüler karsinom (HCC) için önemli risk faktörleridir. Siroz ve sekonder komplikasyonları hem HCC prognozunu hem de tedavi yöntemlerini etkilemektedir. Sirozun kanser başlatıcı etkisinin temelinde karaciğerde tekrarlayan oksidatif ve moleküler hasarın meydana getirdiği tahribat yatmaktadır. Hepatotoksik ajanlar tarafından hasara uğrayan karaciğer hücreleri ROS ve fibrinojenik araçlar salgılar ve inflamatuvar hücreler tarafından akyuvarların hasarlı bölgeye toplanmasını tetikler. Hasarlı hepatositlerin apoptozu ile karaciğer miyofibroblastlarının fibrojenik aktivasyonu indüklenir. Karaciğer fibrozunun patogenezinde kritik bir rol oynayan hepatik stellat hücreleri fibrojenik sitokinler tarafından aktive edilir ve kollajen salgılar. Hepatik stellat hücreleri ROS tarafından da aktive edilir, inflamatuvar ve fibrinojenik sinyallenme başlar. Her iki durumda da ileri derecede karaciğer fibrozu ve siroz oluşabilmektedir (Mederacke vd 2013; Dhar vd 2020). Siroz fibroz aşamasının en üst düzeyi olup hepatositlerde azalma, karaciğer parankiminin bozulması sonucu rejeneratif nodüllerin oluşumu, karaciğerde kan akımında değişiklikler ve fonksiyon bozukluğu ile progresif bir hastalıktır. Sirozlu karaciğerde meydana gelen oksidatif ve metabolik hasarın onarılması için nekroz, inflamasyon ve tekrarlanan rejenerasyon gibi çeşitli yollara başvurulur. Bu süreçler nedeniyle karaciğer hücreleri kanser başlatıcı mutajenlere karşı daha hassas hale gelir (Fattovich vd 2004; Roehlen vd 2020).



Şekil 9. Karaciğer fibrozisi oluşumu (modifiye edilmiştir) (Roehlen vd 2020)

Diyabet ve kanser yaygın görülen hastalıklar olup aynı bireyde aynı anda teşhis edildiği durumlar oldukça yaygındır. Genel olarak kanser hastalarının %8 ile %18'i aynı zamanda diyabet hastasıdır ve prevalans oranları tümör bölgelerine göre değişmektedir.

Karaciğer, endometrium, kolon, meme, mesane ve pankreas gibi birçok kanser türü diyabetle ilişkilidir. Hiperinsülinemi, dolaşımdaki C-peptid/insülin düzeyleri, glisemi belirteçleri, büyüme faktörleri, epigenetik değişiklikler ve diyabet tedavileri diyabetli hastaların kanser patogeneğinde rol oynamaktadır. Kronik hiperinsülinemi, insülinin hem metabolik hem de mitojenik etkileri olan bir büyüme faktörü olması nedeniyle diyabetik hastalarda kanserin başlaması ve ilerlemesinde kritik bir etkidir (Li vd 2017). İnsülinin kanserin ilerlemesini teşvik ettiği ilk kez 1972 yılında deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Heuson vd 1972). Ayrıca diyabet tedavisinde kullanılan ve endojen insülin düzeylerini artıran ilaçların kanser riskini artırdığı insülin duyarlılığını artıran ilaçların ise kanser riskini azaltabileceği ileri sürülmüştür (Chowdhury 2010). Bunların yanısıra birçok kemoterapötik yaklaşım da diyabeti tetikleyebilen veya mevcut diyabeti şiddetlendirebilen steroid tedavisini içermektedir. Bir kanser tedavisi olan kemoradyoterapi hiperglisemiye neden olabilir. Kemoradyoterapi tedavisi gören diyabetik olmayan 91 hasta üzerinde yapılan çalışmada terapi sırasında açlık glukozunun anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür (Nguyen vd 2009).

Hepatoselüler Karsinoma Evrelemesi ve Tedavi Yöntemleri

Hepatoselüler karsinomanın heterojen doğası nedeniyle evreleme solid tümörler için yaygın olarak kullanılan TNM sistemine göre değil, Avrupa ve Amerika klinik uygulama kılavuzları tarafından onaylanan Barselona-Klinik-Karaciğer Kanseri (BCLC) Sınıflandırması'na göre yapılmaktadır. Bu evreleme sistemi beş prognostik alt sınıfı tanımlayarak evreye spesifik tedavileri önermektedir. Cerrahi rezeksiyon, karaciğer nakli ve lokal ablasyon gibi küratif tedaviler, karaciğerdeki tümörleri küçültmek veya kontrol altına almak için Transarteriyel Kemoembolizasyon (TACE), oral veya intravenöz ilaçların kullanıldığı sistemik tedaviler, ağrı ve diğer semptomların yönetimi ve yaşam kalitesini artırmak için başvurulan palyatif bakım HCC'li hastalar için umut vadeten tedavi yaklaşımlarıdır.

Tablo 2. Hepatoselüler Karsinoma Evrelemesi

Evre	Genel Durum
BCLC 0 (Erken Evre)	Tek tümör, 2 cm veya daha küçük boyutta Karaciğer fonksiyonları iyi, belirgin semptom yok Sağkalım için cerrahi rezeksiyon, lokal ablasyon veya karaciğer nakli küratif tedavi yöntemlerine başvurulabilir.

Tablo 2. (devamı)

BCLC A (Erken Evre)	Tek tümör > 2 cm veya her biri ≤ 3cm boyutunda 3 adete kadar tümör Karaciğer fonksiyonları iyi Belirgin semptom yok Sağkalım için cerrahi rezeksiyon, lokal ablasyon veya karaciğer nakli küratif tedavi yöntemlerine başvurulabilir.
BCLC B (Orta Evre)	Her biri >3 cm boyutunda çoklu tümörler, karaciğer dışına yayılım yok Karaciğer fonksiyonları iyi Portal hipertansiyon belirtileri Sağkalım için transarteriyel kemoembolizasyon (TACE) gibi lokal tedavi seçeneklerine başvurulabilir.
BCLC C (İleri Evre)	Karaciğer dışına yayılım (Vasküler invazyon veya ekstrahepatik yayılım) Karın ağrısı, kilo kaybı ve halsizlik gibi belirgin semptomlar Sağkalım için sorafenib gibi multikinaz inhibitörleri sistemik tedavi yöntemlerine başvurulabilir.
BCLC D (Son Evre)	Yaygın hastalık Karın ağrısı, kilo kaybı ve halsizlik gibi belirgin semptomlar Sağkalım için palyatif tedavi ve destekleyici bakım yöntemlerine başvurulabilir.

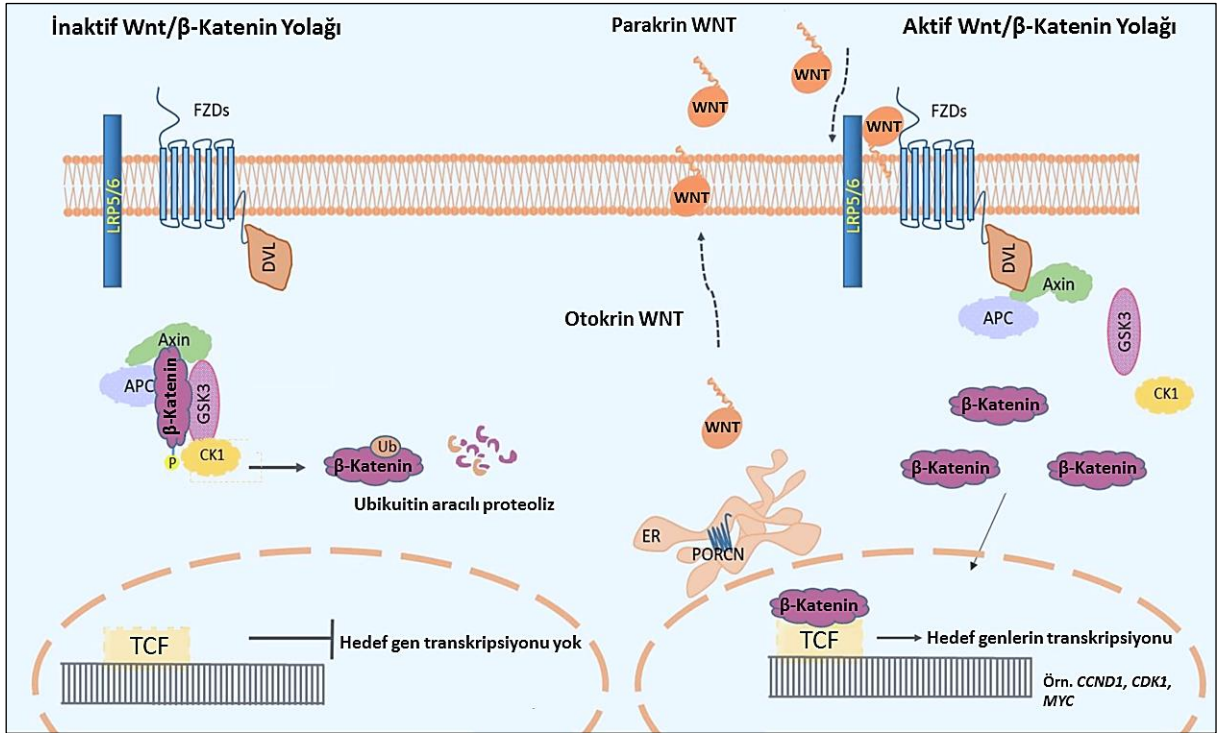
WNT/β-Katenin Sinyal Yolağı

WNT/β-KATENİN sinyal yolağı, hücre çoğalması, mitotik aktivite, hücre tipi spesifikasyonu, apoptoz, embriyonik gelişim, kök hücrelerin kendini yenilemesi, doku homeostazı, hücre onarımı gibi temel fizyolojik süreçleri düzenleyen ve sıkı bir şekilde kontrol edilen moleküler bir mekanizmadır (Zhou vd 2022; Rim vd 2022). Bu yolak salgılanan bir WNT ligandından, alıcı hücre yüzeyindeki aynı kökenli reseptörlerinden ve alıcı hücre içindeki sinyal transdüserlerinden oluşur. WNT/β-KATENİN sinyal yolunun moleküler bileşenleri, hücre yüzeyindeki ligandın tanınmasından çekirdekdeki hedef genlerin transkripsiyonuna kadar birlikte çalışmaktadır. Bu nedenle WNT/β-KATENİN sinyal yolağının düzensizliği gelişimsel kusurlar, dejeneratif bozukluklar ve kansere yol açmaktadır (Rim vd 2022).

Kanonik (β-KATENİN bağımlı) WNT Sinyal Yolağı

Kanonik WNT/β-KATENİN sinyal yolağı iyi karakterize edilmiş bir yolak olup WNT1, WNT2, WNT 3, WNT3a, WNT8a, WNT8b, WNT10a, WNT10b vb. ligandları tarafından uyarılır. Ortamda ligand olmadığında anormal hücresel yanıtın engellenmesi için WNT/β-KATENİN sinyal yolu kapalı tutulmaktadır. Bunun için merkezi efektör olan β-KATENİN (CTNNB1) fosforillenir ve degrade olarak sitoplazmadaki seviyesi düşük tutulur. WNT sinyali olmadan (yolak inaktif), kazein kinaz 1 alfa (CK1α), eksen inhibisyon proteini

(AXIN), adenomatöz polipozis koli (APC) ve glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3 β) proteinlerinden oluşan yıkım kompleksi sitozolik CTNNB1'i fosforile eder, fosforile edilmiş CTNNB1 ise proteazomlar tarafından tanınır ve degrade edilir. WNT ligandlarının Frizzled transmembran reseptörlerine ve LRP5/6 yardımcı reseptörlerine bağlanması ile yıkım kompleksinin işlevi inhibe edilir, sitozolik GSK3 β baskılanarak sitozolik CTNNB1'i fosforile edemez hale getirir. Ardından fosforile edilmemiş CTNNB1 sitozolde birikerek çekirdeğe translokasyonu gerçekleşir ve *MYC*, *siklin D1 (CCND1)* ve *siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1)* gibi birçok hedef genin ekspresyonunu aktive eder (Valenta vd 2012; Schambony ve Wedlich 2013; Catalano vd 2023).

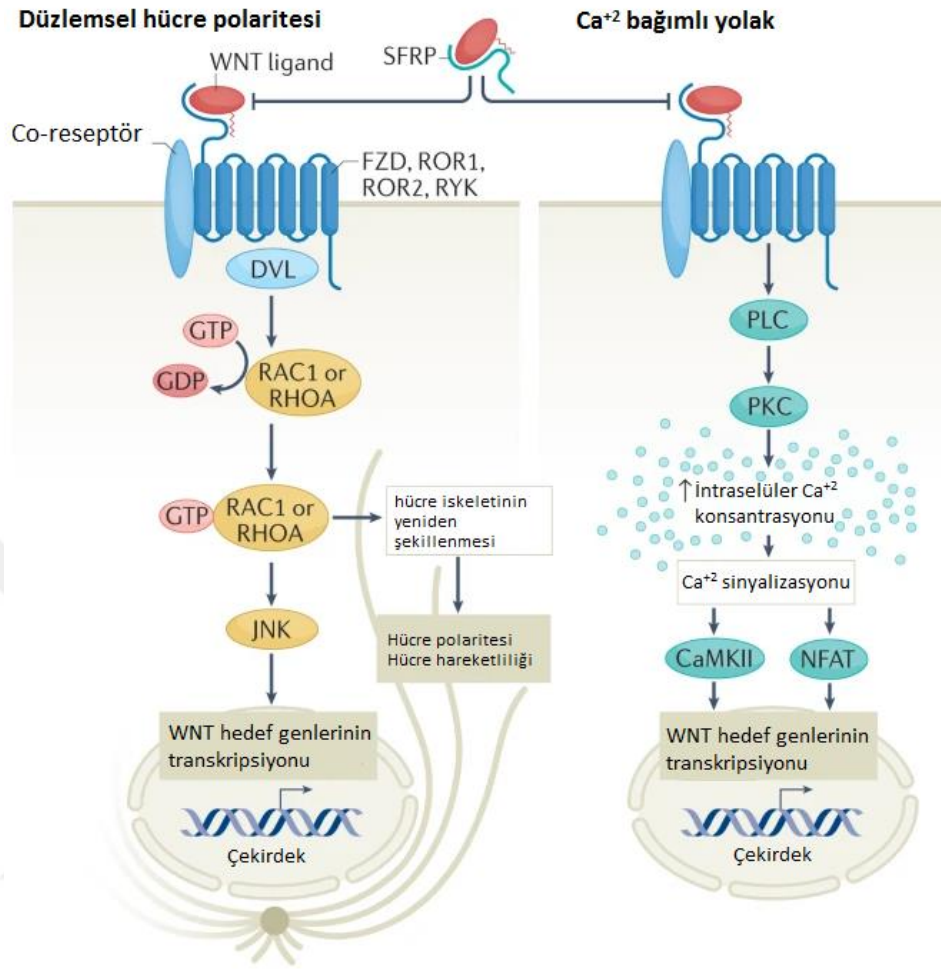


Şekil 10. WNT/β-KATENİN sinyal yolağına genel bakış (modifiye edilmiştir) (Catalano vd 2023)

Kanonik Olmayan (β-KATENİN Bağımsız) WNT Sinyal Yolağı

Planar Hücre Polaritesi (PCP) ve Ca²⁺ yollarını içeren kanonik olmayan (β-KATENİN bağımsız) WNT sinyal yolağı, WNT4, WNT5a, WNT5b, WNT7a, WNT7b ve WNT11 tarafından uyarılmaktadır. Bu kanonik olmayan ligandlar frizzled sınıfı reseptörlere ve reseptör tirozin kinazlara benzeyen orphan reseptör 1 ve 2 (ROR1/2) ve reseptör benzeri tirozin kinaz (RYK) gibi yardımcı reseptörlere bağlanarak sinyal verir (Astudillo 2021). WNT/PCP yolağı RhoA, c-Jun, N terminal kinaz (JNK) ve nemo-benzeri kinaz (NLK) gibi sinyal yollarını aktive ederek morfogenez sırasında hücre hareketini ve doku polaritesini kontrol etmektedir (Xu vd 2020). Ca²⁺ yollarını içeren kanonik olmayan WNT sinyal yolu ise Ca²⁺ mobilizasyonunda görev alır. Aynı zamanda kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein

kinaz II, PKC izoformları, heterotrimerik G proteinleri gibi aşağı yönlü efektörleri aktive eder (Schambony ve Wedlich 2013; Nishita vd 2019; Astudillo 2021).



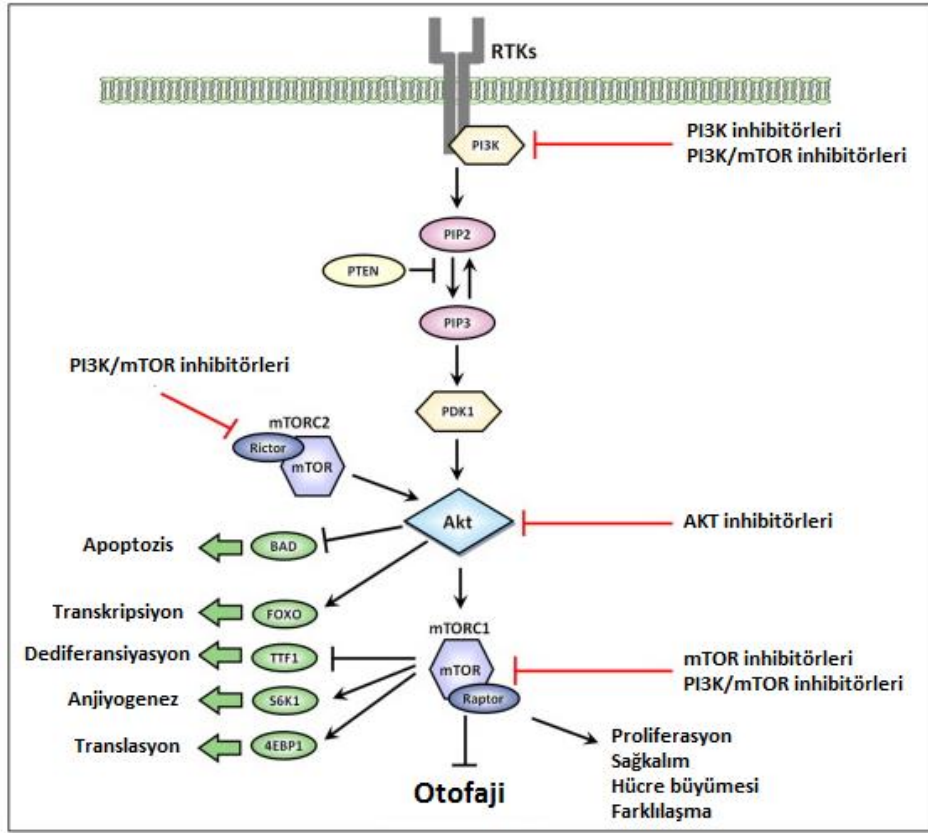
Şekil 11. Kanonik olmayan (β -KATENİN bağımsız) WNT sinyal yolağı (modifiye edilmiştir) (Akoumianakis vd 2022)

PI3K/AKT/mTOR Yolağı

PI3K/AKT/mTOR yolağı, organizmanın büyümesi sırasında insülin sinyalini koordine eden, glukoz homeostazisi, protein sentezi, hücre döngüsü düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, sağkalım, anjiyogenez dâhil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynayan önemli bir hücre içi sinyal iletim yoludur (Zhou vd 2011; Lien vd 2016). Yolağın bileşenlerinden PI3K, AKT ve mTOR gibi aşağı yönlü efektörleri etkinleştirmek amacıyla reseptör kinazlardan (RTK'lar) gelen sinyalleri iletir. RTK monomerleri büyüme faktörleri bağlandığında aktive olup dimerleşerek her bir monomer otofosforile olmasına neden olur ve PI3K/AKT/mTOR yolağının aşağı yönde aktivasyonuna neden olur (Sun vd 2021).

İnsülin, glikoz, birçok büyüme faktörü ve sitokin dâhil olmak üzere çeşitli moleküller, Reseptör-tirozin kinazlar (RTK) ve G-protein reseptörlerine bağlanır, sitoplazmada inaktif durumda olan fosfoditil inositol-3 kinaz (PI3K) aktivasyonu gerçekleşir ve sinyal iletimi

başlar (Sun vd 2020). Reseptörlerin uyarımı sonucu fosfotirozinin p85'te konformasyonel değişikliğe yol açmasıyla PI3K serbest kalarak membrana yerleşir. PI3K'ler tarafından fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2) uyarılır ve fosforilasyon yoluyla fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat (PIP3) oluşumu katalize edilir. PIP3 aracılığıyla bir serin/treonin kinaz olan AKT (protein kinaz B) hücre zarına taşınır. AKT aktivasyonu sonucunda, hücre fonksiyonlarının ilerlemesi için glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), forkhead box 0 (FOXO) transkripsiyon faktörleri ve BAD gibi sinyal proteinleri fosforile olur. AKT, tümör skleroz kompleksi (TSC) aracılığı ile hücre büyümesi ve metabolizmasının ana düzenleyicisi olan mTOR'u fosforiller (Porta vd 2014).



Şekil 12. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına genel bakış (modifiye edilmiştir) (Porta vd 2014)

PI3K'lar tek bir molekül olarak düşünülse de her biri farklı düzenleme, işlev, yapı ve substrat özelliklerine sahip olan IA, IB, II ve III olmak üzere dört sınıfa ayrılır gereklidir (Bhatt ve Damania 2013). PI3K'lar ökaryotik hücre zarlarının iç tarafının bir bileşeni olan fosfoinositidin inositol halkasının 3'-OH grubunun fosforilasyon yeteneği ile karakterize edilen lipid kinaz ailesini oluşturur (Tewari vd 2022). Fosfoinositidler, membranın hücre sinyal komplekslerinin oluşturulmasına yardımcı olur ve hücre içi trafik için gereklidir. Sınıf IA ve IB PI3K, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatın (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata (PIP3) fosforilasyonunu katalize eder. PIP3 üretimi pleckstrin homoloji (PH)-alanının plazma zarında lokalize olmasına izin verir. Ayrıca PIP3 hücre şeklini, hayatta kalmasını,

çoğalmasını, büyümesini ve hareketliliğini kontrol edebilen hücrenel bir ikinci haberci olarak işlev görür (Engelman vd 2006; Bhatt ve Damania 2013). Sınıf I PI3K'ler, bir düzenleyici alt birim ve bir katalitik alt birim içeren heterodimerik proteinlerdir. Düzenleyici alt birimler p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ ve p50 α iken katalitik alt birimler p110 α , p110 β , p110 δ ve p110 γ olmak üzere dört izoformdan birinden oluşur. Birçok memeli dokusunda yaygın olarak p110 α , β ve γ katalitik alt birimleri eksprese edilirken, p110 δ lenfositlerle sınırlıdır (Mishra vd 2021)

AKT (Protein kinaz B), bir serin/treonin kinaz olup PI3K'nın temel aşağı akış efektörlerinden biridir. PI3K'nın aktive olmasıyla birlikte AKT, PH alanı aracılığıyla iç membran transloke olur ve PDK1 tarafından iki kilit rezidü (T308 ve S473) üzerinden fosforile edilir (Martini vd 2017). PI3K'nın hücre dışı uyaranlarla aktivasyonu hemen hemen tüm hücre ve dokularda AKT'nin aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktive olan AKT, mTOR'u Ser 2448 üzerinden fosforile ederek doğrudan mTORC1'i aktive edebilirken, tüberoz skleroz kompleksi 2'yi (TSC2) fosforile ederek dolaylı olarak da aktive edebilir. Ayrıca AKT çeşitli hücrenel fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan birçok kritik substratın fosforilasyonunu sağlar (Li vd 2014; Manning and Toker 2017).

mTOR, maya formundan insan formuna kadar evrimsel olarak korunmuştur ve yaşam için hayati önem taşıyan bir serin/treonin kinazdır. mTOR'un embriyonik mutasyonlarının ölümcül olduğu kanıtlanmıştır (Porta vd 2014). İnsan epidermal büyüme faktörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve ilgili reseptör (VEGFR), IGF-1 ve reseptörü (IGFR-1) gibi çeşitli büyüme faktörleri ve bunlara karşılık gelen reseptörler pozitif büyüme sinyallerini PI3K ve AKT aracılığıyla mTOR'a iletilmektedir (Tewari vd 2022). mTORC1'in değişen aktivasyonu sonucu S6 kinaz-1 (S6K-1), ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein-1 (4EBP-1) ve unc-51 benzeri kinaz 1 (ULK1) gibi birçok efektör etkiler. Bu efektörler HIF-1 α , siklin D1 ve MYC'yi kodlayan mRNA'ların translasyonunu artırarak hücre döngüsü ilerlemesinin veya anjiyogenezin düzenleyicileri olarak görev yapar (Sun vd 2020).

PTEN, ikinci haberci olan PIP3'ün PIP2'ye dönüşümünü katalize eden ve böylece sinyal yayılımında PI3K'nın fonksiyonunu inhibe eden bir lipid fosfatazdır. Ayrıca çeşitli protein substratları için de serin, treonin ve tirozin fosfataz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Birçok kanserde sıklıkla silinen veya mutasyona uğrayan bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır (Mahimainathan ve Choudhury 2004; Lee vd 2018). PTEN'in etkisizleştirilmesi, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) ayırt edici özellikleri olan apiko-bazal polaritenin ve sıkı bağlantıların kaybına yol açarak hücre yayılmasını teşvik etmektedir (Song vd 2012; Lee vd 2018).

PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -KATENİN Sinyal Yolaklarının Kanserdeki Rolü

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, hücre büyümesi, farklılaşma, sağkalım, proliferasyon, tümör gelişimi, migrasyon, metastaz ve hücre iskeletini yeniden düzenlenmesi gibi hücrel olayların gelişiminden sorumlu olduğundan kanser araştırmalarında moleküler hedef olarak oldukça dikkat çekicidir (Porta vd 2014, Xu vd 2020). PI3K/AKT/mTOR sinyalleşmesi doğrudan inhibe edebilen en önemli faktör PTEN olup hücre büyümesini inhibe ederek ve apoptoza hücrel duyarlılığı artırarak bir tümör baskılayıcı olarak görevi görür (Porta vd 2014; Álvarez-Garcia vd 2019).

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun neredeyse tüm kanser türlerinde düzensiz olduğu bilinmektedir. Bu yolaktaki kilit kinazların inhibisyonu hücrel proliferasyonunu azaltarak apoptozun artmasına neden olurken bu kinazların aşırı aktivasyonu ve PTEN ekspresyonunun azalması kanser oluşumunu tetikler (Yang vd 2019; Asati vd 2016). Granato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kuersetinin PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarını inhibe ederek birincil efüzyon lenfoma hücrelerinde (PEL) apoptoz ve otofajiyi indüklediği görülmüştür (Granato vd 2017). Başka bir çalışmada doğal bir kalkon bileşiği olan kardamoninin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) hücre hatlarında (A549 ve H460), PI3K/AKT/mTOR yolunu kısıtlayarak hücre proliferasyonunu baskıladığı ve metastazı inhibe ettiği görülmüştür (Zhou vd 2019). Lim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, turuncgillerden elde edilen doğal bir antioksidan flavonoid olan naringenin prostat kanseri hücre hatları (PC3 ve LNCaP) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları, naringenin apoptozu ve ROS üretimini indüklerken proliferasyonu ve göçü inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Naringenin antikanser etkilerini PI3K/AKT'nin düzenlenmesi ve ERK1/2, p38 ve JNK hücre sinyal yollarının hedeflenmesi yoluyla gerçekleştirdiği görülmüştür (Lim vd 2017).

WNT sinyalleşmesindeki düzensizlikler kanser metastazını indüklemektedir. Kolon kanserinde β -KATENİN ile VEGF ekspresyonunun korele olduğu bilinmektedir. Bu korelasyon anjiyogenezde metastaz riskini artırabilecek bir role sahiptir. Ayrıca akciğer adenokarsinomunda WNT/ β -KATENİN aktivasyonunun yüksek metastaz riskinin bir göstergesi olduğu gösterilmiştir (Nguyen vd 2009; Easwaran vd 2003). WNT sinyal yolunun aktivasyonu radyoterapiye karşı hassasiyeti de etkilemektedir. Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CTNNB1'in yüksek seviyelerinin ölümsüzleştirilmiş bir fare meme hücre hattında (COMMA-Dbeta-geo) radyoterapinin ardından DNA onarımını ve hücre çoğalmasını teşvik ederek direnç gösterdiği görülmüştür (Chen vd 2007).

Bir bitki flavonolu olan kuersetinin anti-inflamatuvar ve antikanser özellikleri nedeniyle PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -KATENİN yollarının hedeflenmesi yoluyla hücre

canlılığı, apoptoz ve otofaji kaybını teşvik etme yeteneği olduğu belirlenmiştir (Reyes-Farias vd 2019).

Strophanthus kōmbe adlı bitkiden üretilen Strofanthin'in insan meme (MCF-7), akciğer (A549) ve karaciğer kanseri (HepG2) hücrelerinde antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Strofanthin, siklin bağımlı kinazlarının ekspresyonlarını kontrol ederek hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu görülmüştür. Ayrıca Strofanthin'in PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -KATENİN sinyalleşmesinden PI3K, AKT, mTOR, ve CTNNB1 gibi anahtar proteinlerin ekspresyonunu inhibe ederek antikanser etki gösterdiği belirlenmiştir (Reddy vd 2020).

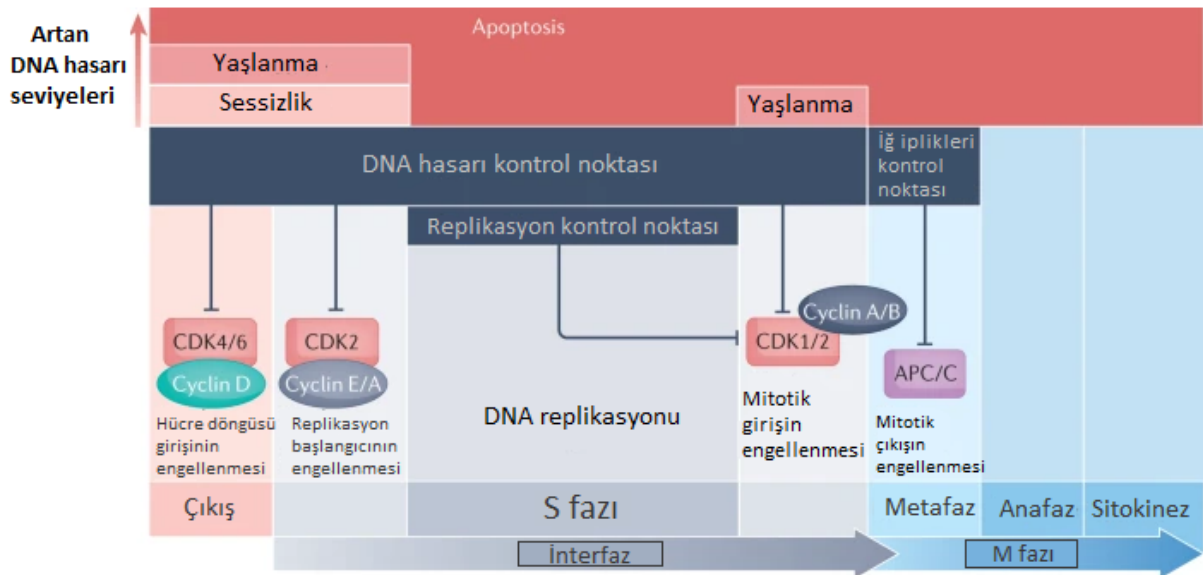
Hepatoselüler karsinomda (HCC) hem kanonik hem de kanonik olmayan WNT sinyal yollarının düzensiz aktivasyonu söz konusudur (Pez vd 2013; Waisberg vd 2015; Liu vd 2016). Her iki sinyal türü de HCC agresifliğine ve direncine yardımcı olurken aynı zamanda tümör büyümesi ve sağkalımı desteklemek için uygun ortam sağlamaktadır. HCC vakalarının yaklaşık %95'inde kanonik yolağın anormal düzenlendiği görülmektedir (Najafi vd 2017).

Hücre Döngüsü Düzenleyicilerinin Kanserdeki Rolü

Sağlıklı hücreler büyüme, çoğalma ve homeostazı sürdürebilmek amacıyla büyümeyi indükleyen ve büyümeyi inhibe eden sinyaller yardımıyla hücre döngüsünü oldukça sıkı bir şekilde kontrol eder. Hücre döngüsü kontrolü, genomik DNA'nın replikasyonu ve bunun farklı hücre döngüsü aşamaları sırasında yavru hücrelere doğru bir şekilde ayırımı olmak üzere iki ana noktaya odaklanmaktadır. Hücre döngüsü kontrol noktalarının kusurlu olması kontrolsüz bir şekilde hücre döngüsü ilerlemesine ve kanser hücrelerinin oluşumuna neden olmaktadır (Matthews vd 2022).

Normal hücrelerde hücre döngüsünün kontrol noktalarından geçiş siklinler, sikline bağımlı kinazlar (CDK'lar) ve bunların inhibitörleri yardımıyla kontrol edilir. CDK'lar hücre döngüsü boyunca inaktif formda sentezlenirler. CDK'ların aksine siklinler hücre döngüsünün spesifik evrelerinde sentezlenirler ve CDK'lara bağlanarak onları aktive ederler. Siklin D, E, A ve B başta olmak üzere hücre döngüsünde görev alan 15'ten fazla siklin tanımlanmış olup bunlar bir veya daha fazla CDK'ya bağlanabilirler. Normal hücre döngüsünde bu düzenleyici proteinler arasındaki regülasyonun kaybedilmesi veya değişikliğe uğraması kanser hücrelerinin oluşumunda en önemli etkenlerden biridir. Yanlış düzenlenen CDK'lar kontrolsüz hücre çoğalması ile birlikte genomik ve kromozomal kararsızlığa neden olmaktadır. Kanserli hücreler incelendiğinde bu regülatör proteinlerin düzeylerinde anormallikler saptanmıştır (Malumbres and Barbacid 2009).

Hücre döngüsünün ilerlemesini ya da G0 evresinde kalmasını sağlayan kilit karar noktalarında büyüme baskılayıcı sinyaller etkilidir. Hücre döngüsü mekanizmasını kontrol eden büyüme baskılayıcı sinyaller retinoblastoma tümör supresör proteini (Rb), p107 ve p130 molekülleri tarafından taşınmaktadır. Fosforillenmemiş Rb, transkripsiyon faktörü E2F ile kompleks oluşturur, E2F aktivitesi baskılanır ve hücre proliferasyonu engellenir. Hücreler G1/S kontrol noktasında büyüme faktörleri ile uyarıldığında siklin D ve siklin E konsantrasyonları yükselerek sırasıyla CDK4/6 ve CDK2 ile kompleks oluşturur. Aktive olan CDK4/6 ve CDK2'nin kinaz aktivitesi Rb, p107 ve p130 dahil retinoblastoma ailesinin fosforillenmesine neden olur. Rb fosforillendikten sonra E2F ile yapılan kompleksten ayrılır ve S fazına geçiş için gerekli hedef olan genlerin transkripsiyonunu aktive eder böylece hücre döngüsü ilerler. S fazına giren hücrede Siklin A/CDK2 kompleksi DNA sentezini başlatır ve ilerletir. DNA replikasyonunu sırasında DNA hasarı meydana geldiğinde, bu hasarın DNA pol ϵ , hücre çekirdeği antijeni (PCNA) ve replikasyon faktörü C (RFC) tarafından tespit edildiği S kontrol noktası devreye girer. S fazında DNA replikasyonunun sorunsuz yapılması durumunda G2 fazına girilir ve bu fazda siklin B/CDK1 kompleksi ile mitoz giriş uyarılır. Bu kompleks hücre döngüsü boyunca siklin B'nin sürekli yapımı ve yıkımı ile kontrol edilmektedir. Mitoz fazındaki kontrol noktası ise metafaz-anafaz evreleri arasındaki geçiş sırasında bulunmaktadır. Anafaz ilerletici bileşik/siklozom (APC/C) kompleksi tarafından düzenlenen mitoz fazı kromozomların eşit bölünmeye hazır olmadığı durumlarda durdurulur (Lim ve Kaldis 2013; Matthews vd 2022).



Şekil 13. Hücre döngüsü kontrol noktaları (modifiye edilmiştir) (Matthews vd 2022)

Kanserin ayırt edici özelliği, hücre bölünmesi döngülerinin devamlılığına ve düzensizliğine neden olan proliferatif sinyalizasyon sürekliliğidir. Kontrolsüz ve sürekli hücre

bölünmesi hem apoptozu önleyen hem de hücre döngüsünden çıkışı tehlikeye atan mutasyonlar tarafından yönlendirilmektedir. Hücreler hücre döngüsünden ya sessiz evreye girerek geri dönüşümlü olarak ya da yaşlanma veya apoptoz yoluyla geri dönüşümsüz olarak çıkabilir. Hücre döngüsünden çıkma kararı, hücre döngüsündeki DNA hasarı kontrol noktasına bağlıdır. İnterfaz boyunca onarılamayan DNA hasarına yanıt olarak, DNA hasarı kontrol noktası p53'e bağlı yollar aracılığıyla programlanmış hücre ölümü başlatılabilir. p53 mutasyonları kanserde en sık rastlanan mutasyonlardır. Bununla birlikte, kanserle ilişkili mutasyonlar hücre döngüsünden çıkışı engellese bile, E2F bağımlı transkripsiyonun aktivasyonuna bağlı olan prereplikatif G1 fazında hücre döngüsü girişi bloke edilerek sürekli çoğalma önlenir. Bu evrede de meydana gelen mutasyonlar E2F'ye bağlı transkripsiyonu indükleyerek S fazına girişi teşvik eder ve bir hücrenin prereplikatif fazda hücre döngüsünden çıkma yeteneğini tehlikeye atar (Matthews vd 2022).

Kansere neden olan hücre döngüsü düzensizliklerine genellikle siklinlerin ve CDK'ların aktivitesindeki değişiklikler aracılık etmektedir. Yanlış düzenlenen CDK'lar başta programlanmamış hücre çoğalması olmak üzere genomik ve kromozomal kararsızlığa da neden olmaktadır. CDK'ların aşağı regülasyonu spesifik dokularda homeostazinin bozulmasına neden olabilirken, aşırı aktivasyonu ise hücrelerde hücre bölünmesini indükleyerek tümör gelişimini destekleyebilir. Tümör hücrelerinde anti-mitojenik sinyallerin kusurlu yanıtına yol açan mutasyonların biriktiği görülmektedir (Deshpande vd 2005; Malumbres ve Barbacid 2009; Zhang vd 2021).

Hücrelerde CDK'ların aktivitesi iki inhibitör ailesi tarafından düzenlenmektedir. Bu ailelerden ilki INK4A, INK4B, INK4C ve INK4D proteinlerinden oluşan INK4 proteinleri ve p21, p27 ve p57 proteinlerinden oluşan Cip ve Kip ailesidir. Bu hücre döngüsü inhibitörlerinin birden çok doku tipinde yetişkin kök hücrelerin çoğalmasını engellediği görülmüştür. CDK inhibitörleri kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini durdurma potansiyeline sahiptir ve kanser tedavisinde oldukça önemlidir (Malumbres ve Barbacid 2009; Cicenas vd 2011).

Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser türleri agresiflik seviyesi, metastaz, heterojenite ve tümör boyutu gibi özellikler bakımından birbirinden oldukça farklıdır, bu nedenle kanser için tek bir tedavi yöntemi söz konusu değildir. Örneğin, lokal ve metastatik olmayan kanserlerde öncelikle cerrahi müdahale ve radyoterapiye başvurulurken metastatik kanserler için anti-kanser ilaçlar kullanılmaktadır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde 2015). Kanser tedavisinde,

kemoterapi, cerrahi müdahale, immunoterapi, radyasyon tedavisi ve gen terapisi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Mun vd 2017).

Cerrahi Müdahale

Birçok kanser türünün tanısı, evresinin belirlenmesi ve tedavisi için cerrahi müdahalelere başvurulmaktadır. Biyopsi, eksfoliyeye cerrahi ile doku örneği alımı, cerrahi eksizyon gibi diagnostik cerrahi müdahaleler kullanılarak kötü huylu tümörün iyi huylu tümörden ayırıcı tanısı yapılabilir. Ayrıca küratif cerrahi yardımıyla lokalize tümör erken evrede uzaklaştırılabilir ve böylece tümör hücrelerinin diğer dokulara metastazı önlenir. Ancak müdahale sonrası bazı kanser hücreleri kalabilir, kanserli dokunun tekrar oluşumu görülebilir ya da tümör damar yoluyla yayılım gösterebilir (Lloyd vd 2006). İleri evre kanserlerde ise semptomların hafifletilmesi ve hastanın yaşam kalitesinin artırılması amacıyla palliatif cerrahiden yararlanılabilir (Inoue vd 2012).

Kemoterapi

Kemoterapi, antikanser ilaçları kullanılarak DNA'yı ve hücre döngüsünü hedef alarak kanser hücrelerini öldürmeyi, metastaz ve invazyonunu engellemeyi amaçlayan, tek başına veya diğer yöntemlerle desteklenerek kullanılabilen bir yöntemdir. Kemoterapi metastatik kanser tedavilerinde kullanılması ve kan dolaşımı yoluyla vücudun her organına ulaşabilmesi açısından etkin bir tedavidir. Kemoterapi intravenöz (doğrudan damara enjeksiyon), oral (hap veya kapsül yoluyla ağızdan), intramüsküler (kas içine enjeksiyon), subkutan (deri altına enjeksiyon) ve topikal (cilt kanserlerinde krem şeklinde) yollarla uygulanabilir. Ancak kemoterapinin prensibi hızlı büyüyen hücrelerin bölünmesini engellemek olduğundan saç folikülleri, kemik iliği ve gastrointestinal sistem hücreleri gibi hızlı bölünen normal hücreleri de etkileyebilir. Bu durum saç dökülmesi, bulantı ve kusma, yorgunluk, ağız ve sindirim sistemi mukozasında yaraların oluşması gibi yan etkilere neden olur. Ayrıca beyaz kan hücrelerinin azalması ile hastanın bağışıklık sisteminin zayıflamasına ve enfeksiyon riskinin artmasına yol açabilir (Pérez-Herrero and Fernández-Medarde 2015).

İmmunoterapi

Bağışıklık sistemi kanser hücrelerinin biyokimyasal farklılıklarından yola çıkarak onları normal hücrelerden ayırt edebilmektedir. İmmunoterapinin amacı da kontrolsüz otoimmün inflamatuvar yanıtlar üretmeden bağışıklık sistemi bileşenlerini tümör hücrelerini öldürmek için kullanmaktır (Abbott ve Ustoyevv 2019; Riley vd 2019). Bu amaçla aşılarda, monoklonal antikolar, sitokinler, kontrol noktası inhibitörleri kullanılarak birçok immunoterapi yaklaşımı geliştirilmiştir. İmmunoterapi, bağışıklık sistemi hücrelerinin

spesifik olarak kanser hücrelerini hedef alması için modüle edilebiliyor olması, uzun süreli yanıt sağlaması ve kemoterapiye kıyasla daha az yan etki oluşturması yönünden avantajlıdır. Ancak bu yöntem, otoimmün reaksiyonlara yol açabilir, her kanser türünde ve her hastada aynı etkiyi göstermeyebilir ve yorgunluk, deri döküntüleri, bağışıklık sistemine bağlı organ iltihaplanmaları ve ishal gibi yan etkiler gösterebilir (Abbott ve Ustoyevv 2019).

Radyoterapi

Radyoterapi, birçok kanser türünün tedavisi için tek başına veya diğer tedavi yöntemleri ile kombinlenerek kullanılan ve kanser hastalarının yaklaşık yarısına uygulanan yaygın bir yöntemdir (Allen vd 2017). Bu yöntemde kanser hücrelerini öldürmek veya tümörleri küçültmek amacıyla yüksek doz radyasyon kullanılır. X ışınları, gama ışınları ve yüklü parçacıklar yardımıyla kanser hücrelerinde DNA hasarı ve serbest radikaller oluşturularak kanser hücrelerinin ölmesi sağlanır (Gong vd 2021). Radyoterapide dikkat edilmesi gereken nokta tümörün yüksek enerjili ışınlar tarafından hedef alınması sırasında sağlıklı dokuları olabildiğince koruyabilmektir (Bozkurt 2022).

Gen Terapisi

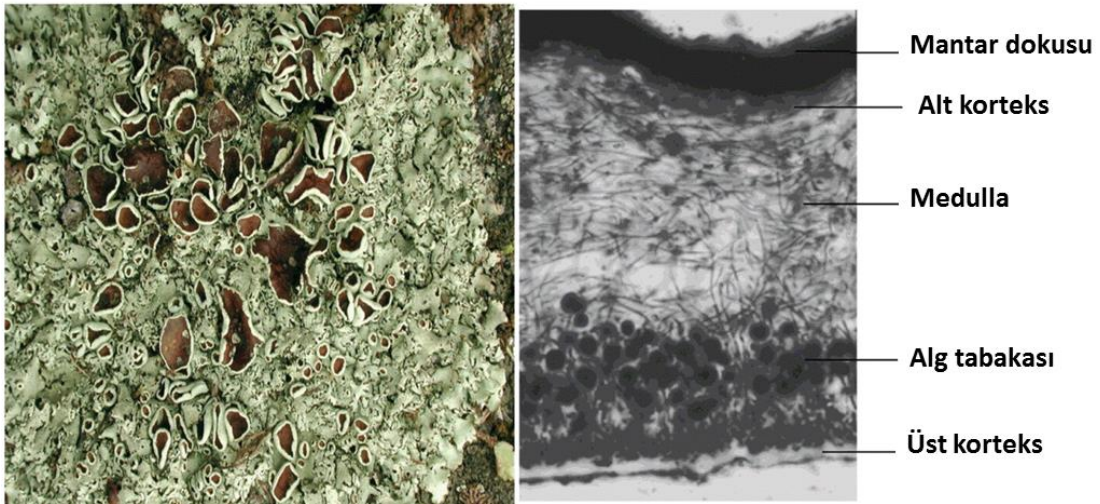
Gen terapisi hatalı genleri doğrudan onarabilme, değiştirebilme, anormal gen ekspresyonunu moleküler seviyede düzeltebilme avantajlarına sahip, hastalıkların doğru ve kişiselleştirilmiş tedavisini mümkün kılabilen bir yöntemdir (Sun vd 2019). Ayrıca gen terapisi ile viral veya viral olmayan vektörler kullanılarak terapötik gen aktivasyonu sağlanabilir, kusurlu genler ise susturulabilir. Kanser oluşumunda rol oynayan genlerin tanımlanmasıyla birlikte kanser tedavisi için de sıklıkla araştırmalara konu olan bu yöntem, kanser hücresine veya dokusuna terapötik genler göndererek apoptozu indüklemeyi veya kanserin büyümesini yavaşlatmayı amaçlar. Kanserde gen terapisi stratejileri onkogen aktivasyonunun inhibisyonu, tümör baskılayıcı genin aktivasyonu, intihar gen terapisi ve antianjiyogenik gen terapisi olarak sınıflandırılabilir (Ergün ve Dora 2023).

Kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel yöntemler kanser hücrelerinde etkili olsa da yol açtıkları yan etkiler, tedaviye karşı zamanla gelişen direnç, sağlıklı hücreleri de hedef alma ve finansal yük oluşturma yönlerinden oldukça dezavantajlı olabilirler (Lin vd 2020). Bu dezavantajlar, kanser tedavisinde hem yeni hem de hedefe yönelik tamamlayıcı ve alternatif yaklaşımların geliştirilmesi ihtiyacını doğurmaktadır. Bu nedenle farklı biyokimyasal/moleküler hedeflere yönelen ve daha az toksisiteye sahip doğal alternatiflerin araştırılması önemli hale gelmiştir (Lin vd 2020). Likenler ve ikincil metabolitleri antikanser

ilaçların geliştirilmesi için umut verici ajanlar olarak ortaya çıkmış olup olumlu etkileri birçok araştırma sonucuna yansımıştır (Correcché vd 2004; Einarsdóttir vd 2010; Papierska vd 2021)

Likenler

Liken, bir mikobiyont (mantar ortağı) ve bir veya daha fazla sayıda zorunlu (obligat) olarak fotosentez yapan fotobiyont (alg veya siyanobakteri) arasındaki simbiyotik ilişki ile oluşan, mutualist yaşayan, yavaş büyüyen ve birçok olumsuz çevre koşuluna dayanıklı kompozit bir konsorsiyumdur (Asplund ve Wardle 2017). Likenler tropik bölgelerden kutuplara kadar dünyanın farklı yerlerinde ve yüzeylerinde bulunabilir. Kayaların üzerinde ve içinde, toprakta, ağaçta, hayvan kabuklarında, beton, tuğla, cam, plastik ve metal gibi insan yapımı yüzeylerde, kutup ve çöllerde büyüebilir hatta radyasyon veya uzay boşluğu gibi abiyotik koşullara dayanabilir. Liken birlikteliğinde mikobiyant ve fotobiyant ortakları farklı görevlere sahiptir. Bu simbiyozda mikobiyont liken morfolojisini belirler, fotobiyontu güneş ışığından ve kurumaktan korur, su ve besin alınmasına, büyümesine yardım eder. Fotobiyont ise mikobiyont için organik besin ve organik azot bileşiklerini üretir (Lutzoni, ve Miadlikowska 2009; Poulsen-Silva vd 2023).



Şekil 14. Likenlerin temel morfolojisi (modifiye edilmiştir) (Zambare vd 2012)

Liken Sekonder Metabolitleri

Likenler, anitmikrobiyal, anti-inflamatuvar, antioksidan, analjezik, antipiretik ve antitümör gibi çeşitli biyolojik özelliğe sahip ikincil metabolitler üretirler (Tripathi vd 2022). Bu ikincil metabolitler temelde likenlerin mantar partneri tarafından üretilerek amorf formda veya kristal halde hüflerin yüzeyine salgılanır ve burada birikir. Düşük molekül ağırlığa sahip bu metabolitler suda zor çözündüklerinden organik çözücüler kullanılarak izole edilirler. Fenolik bileşikler, depsidonlar, dibenzofuranlar, depsidler, alifatik asitler, kinonlar,

antrakinonlar ve pulvinik asit türevleri gibi farklı kimyasal yapıya sahip 1000'den fazla liken sekonder metaboliti bulunmaktadır (Stanojkovic 2019).

Liken Sekonder Metabolitlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Antioksidan aktivite

Reaktif oksijen türlerinin üretimi ile antioksidan savunma aktivitesi arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur ve artmış durumu kanser, diyabet, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik hastalıkla ilişkilendirilir (White vd 2014). Antioksidan aktivite likenlerin karakteristik biyoaktivitelerinden biridir. Antioksidan aktivite gösteren moleküller çoğunlukla reaktif hidroksil grubu içeren fenolik bileşikler olup metal iyonlarını şelatlar ve/veya eşleşmemiş elektronları stabilize ederler. Liken sekonder metabolitlerinin büyük bölümü, fenolik bileşiklerin indirgeyici potansiyeli sayesinde, hidrojen atomu transfer ederek serbest radikalleri stabilize eder ve nötr bir hale getirir. Ayrıca antioksidan enzimlerin ekspresyonunu indüklemektedir (Fernández-Moriano vd 2016).

Antimikrobiyal aktivite

Antibiyotiklere karşı mikrobiyal direncin ortaya çıkması ile birlikte alternatif antimikrobiyal kaynaklara olan ihtiyaç giderek artmaktadır (Wethalawe vd 2021). Likenler doğada bulunan patojenlerin birçoğuna karşı savunma sağlayarak antibiyotik aktivite gösteren sekonder metabolitler üretirler. Likenlerin antibiyotik aktivitesi ilk kez Burkholder ve arkadaşları tarafından 1944 yılında *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*'ye karşı test edilmiştir (Burkholder vd 1944). Bu ön çalışmadan itibaren likenler ve likenlerden izole edilen bileşikler çeşitli gram pozitif, gram negatif ve mikobakterilere karşı test edilmiştir (Karagoz vd 2009; Yuan vd 2010; Kosanić ve Ranković 2011; Shrestha ve Clair 2013). Liken bileşikleri diğer antibiyotik tedavi kaynakları ile kıyasla çok daha düşük konsantrasyonlarında özellikle gram pozitif bakteriler olmak üzere bakteri büyümesini engellemektedir. Usnik asit, orsinol tipi depsidler ve depsidonlar, vulpinik asit gibi pulvinik asit türevleri oldukça etkili antibakteriyal etkinlik gösteren liken sekonder metabolitlerindedir (Shrestha ve Clair 2013). Ayrıca antiviral ve antifungal aktivite gösteren birçok liken sekonder metaboliti bulunmaktadır. Usnik asit, izodivarikatik asit, parietin, antrakinon, salazinik asit, 5-propilresorsinol, divarikatinik asit antifungal aktiviteye sahip liken bileşiklerine örnek olarak verilebilir. Atrakinonlar güçlü antiviral aktivite gösteren sekonder bileşiklerdendir (Zambare ve Christopher 2012).

Anti-inflamatuvar aktivite

İnflamasyon organizmaların homeostazisini bozan patojen mikroorganizmalar, hasarlı hücreler, doku hasarına, kimyasal veya fiziksel ajanlar gibi faktörlere karşı verdiği dinamik bir tepkidir. Bu tepkinin uzun süreli devam etmesi durumunda inflamatuvar süreç farklı bir karakter kazanarak diyabet, kanser, obezite, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkları oluşumunu teşvik eden kronik bir hal alır. Kronik inflamasyon süreci TNF- α veya IL-1 gibi proinflamatuvar araçların salınması ile başlamaktadır (Nunes vd 2020). Bu inflamatuvar araçlar anti-inflamatuvar aktiviteye sahip liken sekonder metabolitlerinin olası hedefleridir (Paździora vd 2023). Örneğin, bir çalışmada usnik asidin farelerde lipopolisakkarit tarafından indüklenen akut akciğer hasarının inflamatuvar tepkilerini zayıflattığı görüldü. Ayrıca usnik asit, interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve tümör nekroz alfa (TNF- α) dâhil proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu azaltarak bronkoalveolar lavaj sıvısında anti-inflamatuvar sitokin seviyesini artırmıştır (Su vd 2014)

Antikanser ve sitotoksik aktivite

Liken metabolitleri mikromolar konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu sonlandırma yeteneğine sahiptir. Bu metabolitlerin kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivitesinin normal hücrelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Liken bileşiklerindeki farklı fonksiyonel grupların konumu sitotoksikite düzeylerini etkilemektedir. Liken asitleri G2/M, S veya G0/G1 fazlarında hücre döngüsünün durdurarak, apoptoz, nekroz ve otofajiyi indükleyerek, anjiyogenez inhibisyonunu sağlayarak kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (Koparal vd 2010; Bačkorová vd 2012; Brisdelli vd 2013; Koparal vd 2015). Ayrıca liken metabolitleri siklinler ve siklin bağımlı kinazlar aracılığıyla hücre döngüsünün düzenleyicileri olarak da görev yaparlar (Shrestha ve Clair 2013).

Bir çalışmada, likenlerden üretilen 15 adet sekonder metabolitin (depsidler, depsidonlar ve usnik asit) sitotoksik ve apoptotik potansiyelleri sıçan hepatositlerinin primer kültürleri üzerinde, apoptoz ile ilişkili bir dizi belirteç yardımıyla araştırılmıştır. Bulgular bu liken metabolitlerinden salazininik asit, psoromik asit ve stiktik asidin oldukça kritik apoptotik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Correcché vd 2004).

Yapısal olarak farklı üç liken metaboliti (protolichesterinik asit, lobarik asit ve baeomycesik asit) lösemi, pankreas, meme, prostat, küçük hücreli akciğer, yumurtalık, mide kanserine ait 12 farklı insan kanser hücre hattına karşı Lipoksijenaz (LOX) hedefli anti-proliferatif etkiler için test edilmiştir. Liken metabolitlerinin aktivitesi spesifik bir 5-LOX inhibitörü olan zileuton ile karşılaştırılarak tüm bileşiklerin in vitro 5-LOX inhibitör

aktivitesine sahip olduğu ayrıca protolichesterinik asit ve lobarik asidin 12-LOX'u da inhibe ettiği görülmüştür (Haraldsdóttir vd 2004).

Meme (T-47D) ve pankreas (Capan-2) hücre hatları kullanılarak yapılan bir çalışmada, hem *Cladonia arbuscula*'dan hem de *Alectoria ochroleuca*'dan elde edilen usnik asidin belirlenen IC50 değerlerinde DNA sentezini inhibe ettikleri ve hücre döngüsünü S fazında durdurduğu belirlenmiştir (Einarsdóttir vd 2010).

2006 yılında yapılan bir çalışmada, likenlerden izole edilen sekonder metabolitler olan pannarin, faeroforin ve epiforellik asit-1'in, prostat kanseri hücre hattı (DU-145) üzerinde hücre ölümünü tetikleyerek antitümör aktivite gösterdiği görülmüştür (Russo vd 2006). 2012 yılında ise aynı ekip liken bileşiklerinin etkileri üzerine yaptıkları çalışmayı genişleterek, atranorin, divarikatik asit, depsidon vicanisin, difraktaik asit ve protolikesterinik asidin prostat kanseri hücre hatları olan DU-145 ve LNCaP'ta hücre büyümesini engelleyebildiğini, kısmen de olsa Hsp70 ekspresyonunun inhibisyonu aracılığıyla apoptoza yönlendirdiğini göstermiştir (Russo vd 2012).

Cardile ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada bir depsidon olan fisodik asidin A375 melanom kanseri hücre hattında Hsp70 ekspresyonunun azaltarak apoptotik süreci aktive ettiği görülmüştür (Cardile vd 2017).

2017 yılında yapılan bir başka çalışmada, *Xanthoparmelia somloensis*, *Everniastrum vexans*, *Rhizoplaca chrysoleuca*, *Ramalina sp.* ve *Thamnolia vermicularis* olmak üzere beş liken türünün invazyon ve metastaz üzerine inhibisyon etkisi akciğer kanseri hücre hattı (A549) kullanılarak araştırılmıştır. Bu beş liken asidinden *E. Vexans*'ın ve onun aseton ekstresinden elde edilen alt bileşenlerinden atranorinin hücre hareketliliğine karşı oldukça güçlü bir inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Ayrıca atranorinin CTNNB1 aracılı TOPFLASH aktivitesini azalttığı, hücre içerisinde CTNNB1 dağılımını değiştirdiği, AP-1, WNT ve STAT sinyalleşmesini etkilediği, RhoGTPase aktivitesini baskıladığı, *CCND1*, *c-jun* ve *c-fos*'un gen ekspresyon seviyelerini azalttığı belirlenmiş, hücre hareketliliğini ve tümör oluşumunu engelleyebileceği saptanmıştır (Zhou vd 2017).

Stereocaulon alpnum liken türünden elde edilen lobarstin ve lobarik asidin antikanser potansiyeli, kolon kanseri (HCT116) ve HeLa hücreleri üzerinden değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda bu iki liken sekonder metabolitinin HCT116 ve HeLa hücrelerinin proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Lobarstin ve lobarik asit muamelesinin ardından hücre döngüsünün G2/M fazında durduğu ve Bcl-2 ekspresyon seviyesinin kritik ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca Flowsitometri analizi yardımıyla her iki kanser hücre hattında da apoptoz meydana geldiği görülmüştür. Tüm

bulgular lobarstin ve lobarik asidin serviks ve mide kanserlerinin klinik tedavisi için yeni terapötik ajanlar olabileceğini göstermiştir (Hong vd 2018).

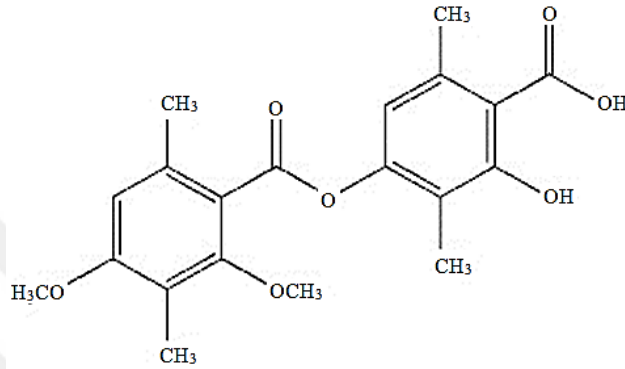
2020 yılında yapılan bir çalışmada sitotoksik etkisi olduğu bilinen usnik asidin çeşitli türevleri sentezlenmiş ve insan meme (MCF-7), serviks (HeLa), deri (HDFa) ve prostat (PC-3) kanseri hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitesi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, başta izoksazoller olmak üzere sentezlenen bileşiklerin çalışma kapsamındaki tüm hücre hatlarında sağkalımı doza ve zamana bağlı olarak inhibe ettiği görülmüştür. Dahası tüm usnik asit türevlerinin HeLa ve MCF-7 hücre hatlarında hücre döngüsünü G0/G1 geçişinde durdurduğu, ayrıca HeLa hücrelerinde S ve G2/M fazlarında hücre fraksiyonunda bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir (Pyrzack-Felczykowska vd 2020).

İnsan mide adenokarsinomu (AGS) ve mide kanseri (SNU-1) hücrelerine doza bağlı usnik asit uygulanmasının (10-25 μ M) mitokondriyal membran depolarizasyonuna ve apoptoza neden olduğu görülmüştür. Apoptozun indüklenmesiyle birlikte BAX/BCL-2 ekspresyonu ve bölünmüş-PARP oranında artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca usnik asidin toksik olmayan konsantrasyonları (1-10 μ M) insan mide kanseri hücre hattında koloni oluşturma yeteneğini inhibe ettiği ve proliferasyonu engellediği belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, mide kanseri hücrelerinde yüksek oranda ölüme neden olan usnik asit konsantrasyonu, sağlıklı insan embriyonik böbrek hücrelerine (HEK293), insan keratinosit hücrelerine (HaCaT) ve fare primer mide hücrelerine toksik etki göstermemiştir (Kumar vd 2020).

DLD-1 ve HCT116 hücre hatlarında liken sekonder metabolitlerinden salazinik asit ve fizodik asidin NF- κ B, Nrf2 ve STAT3 sinyal yolları üzerine etkisi qPCR ve western blot analizleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu iki liken metaboliti ile muamelenin ardından, NF- κ B'nin p50 ve p60 alt birimlerinin ekspresyonunda, dolayısıyla NF- κ B hedef genleri olan iNOS ve COX-2'nin ekspresyon seviyesinde ve nükleer protein seviyelerinde azalış görülmüştür. Kanser hücrelerinde NF- κ B'nin baskılandığı ve Nrf2 sinyalinin aktive olduğu gözlenmiştir. Ayrıca salazinik asit ve fizodik asidin HCT116 ve DLD-1 hücre hatlarında p-STAT3 protein seviyesinin ve buna bağlı olarak anti-apoptotik protein olan Bcl-xl'nin ekspresyon seviyesinin azalması görülmüştür. Sonuç olarak bu iki liken metaboliti, Nrf2, NF- κ B ve STAT3 yollarını etkileyerek apoptozu indüklediği ve anti-inflamatuvar aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Papierska vd 2021).

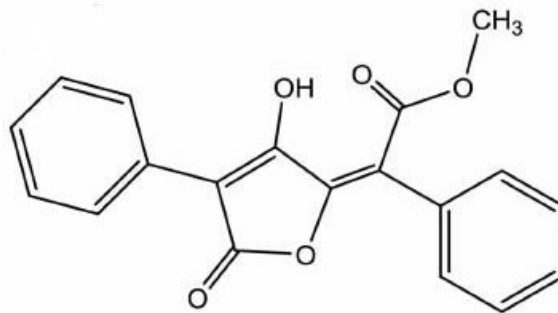
Tez Kapsamında Çalışılan Liken Asitleri

Difraktaik asit depsid türevi olan *Usnea* ve *Parmelia* gibi liken türlerinden elde edilen bir sekonder metabolittir. Difraktaik asidin antiviral, antipiretik, antiproliferatif ve antitümöral aktivitelere sahip olduğu bililmektedir (de Castro Fonseca vd 2016). Önceki yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda difraktaik asidin, insan akciğer (NCI-H460), meme (MCF-7), serviks (HeLa), glioblastoma (U87MG-GBM) ve kolon (HCT-116) kanseri hücre hatlarında hücre büyümesini engellediği ve güçlü sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Truong vd 2014, Brisdelli vd 2013; Emsen vd 2018).



Şekil 15. Difraktaik asidin kimyasal yapısı (Karagoz vd 2015)

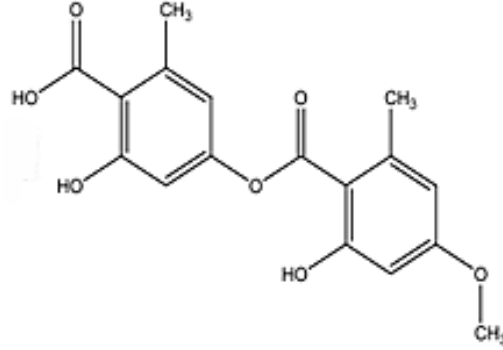
Letharia vulpina liken türünden elde edilen vulpinik asit umut verici liken sekonder metabolitlerinden biridir (Cansaran-Duman vd 2021). Vulpinik asidin sitotoksik ve antiproliferatif etkileri birkaç kanser hücre hattı için araştırılmıştır. Bir çalışmada metastatik prostat kanseri (mPC) hücre hattında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı, hücre döngüsünü G0/G1evresinde tutuklayarak erken apoptotik etkilere neden olduğu gösterilmiştir (Cansaran-Duman vd 2021). Başka bir çalışmada ise vulpinik asidin insan epidermal melanosit hücrelerine zarar vermeden A-375 melanoma kanser hücre hattı üzerinde güçlü bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Yangın vd 2022).



Şekil 16. Vulpinik asidin kimyasal yapısı (Koparal 2015)

Evernik asit *Evernia* türlerinden izole edilebilen ve başta antifungal olmak üzere antioksidan, anti-inflamatuvar ve antimikrobiyal sahip olduğu bilinen bir sekonder

metabolittir (Kosanić vd 2013; Gökalsın ve Sesal 2016). Yapılan bir çalışmada evernik asidin akciğer kanseri hücre hattında (A549) hücre proliferasyonunu azalttığı ve kanser tedavisinde yeni bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir (Kızıl vd 2015).



Şekil 17. Evernik asidin kimyasal yapısı (Manojlovic 2020)

Difraktaik, evernik ve vulpinik asidin insan meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerinde doz ve zamana bağlı, TRXR1 hedefli olarak antikanser etki gösterdiği görülmüştür (Kalın vd 2022). Ayrıca bu asitlerin akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında difraktaik, evernik ve vulpinik asidin doz ve zamana bağlı olarak TRXR1 hedefli antikanser etkisi belirlenmiştir (Günaydın vd 2023; Sulukoğlu vd 2024). Özellikle evernik asidin antikanser aktivitesini A549 hücrelerinde apoptozu desteklemekle birlikte migrasyonu güçlü bir şekilde engelleyerek gösterdiği açığa çıkarılmıştır (Günaydın vd 2023).

MATERYAL ve METOD

Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Kimyasal Adı	Firma
β -Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
Akrilamid	Sigma-Aldrich
Amoyum Persulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Bisakrilamid	Sigma-Aldrich
Bromfenol Mavisi	Sigma-Aldrich
Coomassie-Brillant Blue G-250	Fluka
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems
Difraktaik Asit	Targetmol
Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (DPBS)	Sigma-Aldrich
ECL Reagent Substratları	Bio-Rad
Etanol	Isolab
Evernik Asit	Cayman Chemical Company
Fenilmetilsülfonil Flüorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Glisin	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Polivinilidin Diflorid Membran (PVDF)	Macherey-Nagel
Primer	Oligomer
Protein Marker	New England BioLabs
PureLink™ RNA Mini Kiti	İnvitrogen
RIPA Tamponu	Cell Signaling Technology
Sekonder Antikor (Keçi Anti-Fare IgG-HRP)	Santa Cruz Biotechnology
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
SYBR Green qPCR Master Mix	Bio-Rad
Trisma Base	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Whatman Blotlama Kâğıdı	Bio-Rad
Vulpinik Asit	Cayman Chemical Company
N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
İzopropil Alkol	Sigma-Aldrich

Tablo 3. (devamı)

Sodyum Klorür	Sigma-Aldrich
Potasyum Klorür	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit	Sigma-Aldrich
Fosforik Asit	Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albümin (BSA)	Sigma-Aldrich
Yağsız Süt Tozu	Sigma-Aldrich

Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Tablo 4. Tez Kapsamında Kullanılan Materyal ve Cihazlar

MATERYAL – CİHAZ	MARKA
Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	Bio-Rad
Görüntüleme Cihaz	Bio-Rad
Buzdolabı (+4 °C)	Uğur
Çeker Ocak	Tolkim
Derin Dondurucu (-20 °C)	Profilo
Derin Dondurucu (-86 °C)	Nuaire
Distile Su (dH ₂ O) Üretme Cihazı	Milipore Direct-Q8UV
Elektroforez Cihazı	Bio-Rad
Etüv	Memmert
Güç Kaynağı	Thermo EC 135-90
Hassas Terazî	Shımadzu
Isıtıcı Bloğu	VWR Digital Heatblock
Kar Üretme Cihazı	Scotsman
Magnetik Karıştırıcı	Wis WiseStir MSH-20A
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Mini Santrifüj	IKA miniG
Nanodrop	Thermo Scientific Multiscan GO
Otoklav	HMC Hirayama
PCR	Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler
pH Metre	Mettler Toledo
Pipet Uçları	Isolab
Real Time PCR	Qiagen
Santrifüj	Hettich
Serolojik Pipetler	Labsolute
Sıcak Su Banyosu	Memmert
Sıvı Azot Tankı	Taylor- Wharton LS750 Lab System

Tablo 4. (devamı)

Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter
Steril Kabin (Biyogüvenlik Kabin)	NUAIRE 425-500E ESCO Marka Class 2
Vorteks	Wisd WiseMix VM-10/Heidolph
4'lü Strip Tüpler	Qiagen
96 Kuyucuklu Plaka	Labsolute/Greiner bio-one
1 ve 3 mL'lik Kuvarz Küvetler	Merck
UV-VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter

Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı**Tablo 5.** Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

ÇÖZELTİ ADI	HAZIRLANIŞI
%70'lik Etil Alkol	30 mL saf su üzerine 70 mL etil alkol eklenerek hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid	128 mL dH ₂ O içerisinde 37,5 g akrilamid ve 1 g bisakrilamid 37°C'de çözdürüldü. Karanlık ortamda oda sıcaklığında saklandı.
%10'luk SDS	1 g SDS tartıldı ve 9 mL saf su içerisinde çözdürüldü. Oda sıcaklığında saklandı.
%10'luk APS	0,2 g APS tartıldı ve 1.8 mL saf suda çözdürüldü. Oda sıcaklığında saklandı.
Lizis Buffer (%1 2- Merkaptotanol)	1 mL Lizis buffer üzerine 10 µL 2-Merkaptotanol eklenerek hazırlandı (RNA izolasyonunda kullanılmak üzere). Oda sıcaklığında saklandı.
1X Lizis Tampon (1 mM PMSF içeren RIPA buffer)	1/10 oranında ddH ₂ O ile seyreltilen RIPA buffer üzerine 1 mM PMSF eklenerek hazırlandı (Protein izolasyonunda kullanılmak üzere).
%5'lik Bloklama Çözeltisi	5 g yağsız süt tozu tartıldı ve 95 mL 1X TBST içerisinde çözdürüldü. Oda sıcaklığında saklandı.
Bradford (Commassie Brilliant Blue) Çözeltisi	100 mg Coomassie-Brillant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldükten sonra 110 mL %85'lik fosforik asit çözeltisi eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlandı. Alüminyum folyo ile kaplandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.
10X TBS Çözeltisi	80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris tartılarak 900 mL dH ₂ O içerisinde çözdürüldü. 1 M HCl ile pH=7,4'e ayarlandı ve saf su ile hacim 1 L'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
1X TBST Çözeltisi	10X TBS'den 100 mL alınarak 900 mL dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. Üzerine 1 mL Tween-20 eklendi. Oda sıcaklığında saklandı.
0,2 mg/mL BSA	2 mg BSA tartıldı ve dH ₂ O ile son hacim 10 mL'ye tamamlandı. 4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 5. (devamı)

10X Transfer Çözeltisi	29 g glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS tartılarak 900 mL dH ₂ O içinde çözdürüldükten sonra pH=8.3' e ayarlandı. Son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
1X Transfer Çözeltisi	10X Transfer çözeltisinden 100 mL alınarak üzerine 700 mL saf su ve 200 mL metanol eklendi. Oda sıcaklığında saklandı.
10X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	30,2 g Tris ve 188 g Glisin tartılarak 100 mL %10'luk SDS eklendi. 1 L dH ₂ O ile çözdürüldü. 4°C'de muhafaza edildi.
1X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	10X Tris-Glisin elektroforez çözeltisinden 100 mL alınarak 900 mL dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. 4°C'de muhafaza edildi.
1 M Tris/ HCl Tamponu	121,14 g Tris 900 mL dH ₂ O içinde çözdürüldü. 1 M HCl ile pH: 6,8'e ayarlandıktan sonra dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
1,5 M Tris/HCl Tamponu	181,7 g Tris 900 mL dH ₂ O içinde çözdürüldü. 1 M HCl ile pH: 8,8'e ayarlandıktan sonra dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
1X SDS-PAGE Yükleme Tamponu	0,125 M Tris pH 6.8, %2 SDS, %10 (v/v) gliserol, %10 (v/v) β-merkaptoetanol, ve %0,01 (w/v) bromfenol mavisi) karıştırılarak hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanser hücre hatları kullanıldı. Sıvı azot tankında (-196°C'de) bulunan hücreler çıkarıldı, çözdürüldükten sonra komplet besiyeri bulunan falkon tüpüne aktarıldı. 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. A549 ve HepG2 hücre hatları için %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan sırasıyla Ham's F-12K (Kaighn's) ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) komplet besiyerleri kullanıldı. Santifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve dibe çöken hücreleri içeren pellete komplet besiyeri eklendi. Ardından hücreler çözdürüldü ve T-25 ve T-75 flasklara ekimi sağlandı. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Araştırmanın amacına ve hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak flask yüzeyi %70-80 doluluğa ulaşıncaya kadar her 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi. Hücre kültürü çalışmaları için Class II tip steril kabin kullanıldı. Çalışmalar süresince steril kabin ve kabin içine alınan her malzeme %70'lik etanol ile muamele edildi.

Hücrelerin pasajlanması

Araştırmanın amacına ve hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak flask yüzeyi %70-80 doluluğa ulaşıncaya aşağıdaki prosedür takip edilerek pasajlama işlemi yapıldı.

- İlk olarak eski medyum uzaklaştırıldı.
- Safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkama yapıldı.
- Hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak amacıyla Tripsin-EDTA (%0,25) eklenerek 2-3 dakika inkübatörde bekletildi.
- Tripsini inaktif etmek amacıyla tripsin miktarının 3 katı kadar komplet besiyeri ilave edildi.
- Ardından hücreler 5 dakika boyunca 1300 rpm'de santrifüjlendi.
- Uygun sayıda hücreler flasklara ekildi ve büyümeleri için 37 °C ve %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde bekletildi.

Hücrelerin dondurulması

Dondurularak stoklanması amacıyla, hücreler flasklardan kaldırılarak içerisinde %5 oranında DMSO içeren komplet besiyeri ile hazırlanan freezing (dondurma) besiyeri ile 2 mL'lik kriyo tüplere aktarıldı. Kriyo tüpler Mr. Frosty™ içerisine koyulup -20°C'de 40-50 dakika boyunca bekletildikten sonra ilk olarak -80 °C'ye ardından da -196°C'deki sıvı azota kaldırıldı (Günaydın vd 2022; Sulukoğlu vd 2022; Zheng vd 2018)

Hücrelerin sayımı

Hücre sayımı için eppendorf tüp içerisine 100 µl hücre süspansiyonu ve 100 µl tripan mavisi eklendi. Tripan mavisi cansız hücrelerin içerisine girerek mavi renkte görünmelerini sağlar. Ancak canlı hücrelerin içerisine giremediğinden hücreler parlak olarak görünürler. Bu boya ve hücre karışımından 10'ar µl alındı ve sayım için kullanılan Thoma lamına aktarıldı. Canlı hücrelerin sayımı ters ışık (inverted) mikroskobu kullanılarak yapıldı ve mL başına düşen hücre sayısı aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı/mL} = \text{Sayılan ortalama hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

Dilüsyon faktörü: Seyreltme faktörü 2 (100 µl hücre süspansiyonu, 100 µl tripan mavisi) olarak alındı.

10⁴: 0,1 mm³'teki sayım sonucunu 1 mL'deki sayıya dönüştürmek amacıyla kullanılan sabit değer.

Liken asitlerinin hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan liken asitleri (difraktaik, evernik ve vulpinik asit) ticari olarak satın alındı. Liken asitleri DMSO içerisinde çözöldü. İçerisinde bulunan oksijen gazının uzaklaştırılması amacıyla kullanımdan önce DMSO içerisinde 5 dakika boyunca azot gazı geçirildi. Daha sonra vortekslendi ve iyice çözönmesi için +4°C'ye ayarlanan sonikatörde 10 dakika bekletildi. İnkübasyonun ardından alikuatlara ayrılarak kullanılmıncaya kadar -20°C'ye kaldırıldı.

Hücrelerin liken asitleri ile muamelesi

Difraktaik, vulpinik ve evernik asidin insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatları üzerinde antikanser ajan olarak potansiyeli TrxR1 hedefli olarak 119Z112 nolu TUBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi kapsamında araştırılmıştır. Bu araştırma kapsamında liken asitlerinin, insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hatlarındaki sitotoksik etkisi doza ve zamana bağılı olarak XTT ((2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)) analizi ile incelenerek IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir (Günaydın 2022; Sulukoğlu 2022). Bu tez kapsamında, bahsi geçen çalışmada hesaplanmış olan IC₅₀ değerleri kullanılarak insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatları difraktaik (48h), vulpinik (48h) ve evernik asit (24h) ile muamele edildi.

Kontrol ve muamele grubu hücre hatları, komplet besiyeri içerisinde, 6 kuyucuklu plaklara 2 mL (3x10⁵ hücre/mL) olacak şekilde ekildi ve 37°C'de % 5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde bir gece bekletildi. İnkübasyonun ardından besiyeri uzaklaştırıldı, kuyucuklar 1 mL PBS ile yıkanacak ve PBS uzaklaştırıldı. Muamele grubu taze komplet besiyeri içerisinde ve daha önceki çalışmalarda belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarında hazırlanan liken asitleri (2mL) 6 kuyucuklu plakalara eklenip 37°C'de % 5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde zaman bağımlı olarak (24 ve 48h) inkübe edildi. A549 ve HepG2 hücreleri difraktaik ve vulpinik asitle 48 saat, evernik asitle 24 saat muamele edildi. Kontrol grubuna ise sadece komplet besiyeri ilave edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri aspire edildi ve 1 mL PBS ile yıkama yapıldı. Ardından hücreler plak tabanından tripsin-EDTA (% 0,25) ile kaldırıldı ve PBS ile ependorf tüplerine alındı.

Kantitatif Gen Ekspresyon (Real Time PCR) Analizi

Total RNA izolasyonu

A549 ve HepG2 hücre hatları, 6 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucuğa 2'şer mL (150 000 hücre/mL) olacak şekilde ekildi. Ardından yapışmalarını sağlamak amacıyla 37°C'de %

5'lik CO₂ ayarlı inkübatör kullanılarak %60-70 doluluğa ulaşıncaya kadar bekletildi. İnkübasyon sonrasında besiyeri aspire edildi, kuyucuklar DPBS tampon ile yıkandı ve ardından DPBS tampon uzaklaştırıldı. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarına göre hazırlanan liken asitleri ile taze komplet besiyeri 3'er tekrar olacak şekilde her bir kuyucuğa eklendi ve muamele grupları oluşturuldu. Kontrol grubu ise kuyucuklara yine 3'er tekrar olacak şekilde komplet besiyeri eklendi. Ardından evernik asit ile muamele edilen hücreler 24 saat, difraktaik ve vulpinik asitle muamele edilen hücreler ise 48 saat boyunca 37°C de % 5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra besiyeri uzaklaştırılarak DPBS tamponu ile yıkama yapıldı. Her bir kuyucuğa 600 µL lizis tamponu (her bir 1 mL lizis tamponu için 10 µL β-merkaptetanol) eklendi ve yüzeydeki hücreler toplandı. RNA izolasyonu ise PureLink™ RNA Mini Kit kullanılarak aşağıda verilen kit protokolüne göre yapıldı.

- 1,5 mL'lik ependorf tüplerindeki hücrelerin üzerine lizis tamponu eklendi ve vortekslenerek 12 000 g'de oda sıcaklığında 2 dk santrifüjlendi.
- Santrifüjün ardından her bir süpernatant RNase-free tüpe alındı.
- Süpernatant üzerine 1:1 oranında 600 µL %70 etanol eklendi ve vortekslendi.
- Spin kolona süpernatant + etanol karışımından 700 µL eklendi.
- 12 000 g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj yapılarak kolonun altında kalan sıvı uzaklaştırıldı. Geriye kalan yaklaşık 500 µL süpernatant + etanol karışımı kolonlara eklendi ve tekrar 12 000 g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında altta kalan sıvı uzaklaştırıldı.
- Kitte bulunan Wash Buffer I'den 700 µL eklenerek 12 000 g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj yapıldı. Çöken sıvı uzaklaştırıldı ve bu basamak tekrarlandı.
- Ardından 12 000 g'de oda sıcaklığında 2 dk boyunca kolona ekleme yapılmadan santrifüj yapıldı ve toplama tüpü atıldı. Kolonlar yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolonlara yine kitte bulunan Wash Buffer II'den 500 µL eklenerek 12 000 g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj yapıldı. Kolonların altında kalan sıvı uzaklaştırıldı. Bu basamak 2 kez tekrarlandı.
- Ardından 12 000 g'de oda sıcaklığında 2 dk boyunca kolona ekleme yapılmadan santrifüj yapıldı ve toplama tüpü atıldı. Kolonlar yeni bir toplama tüpü içine yerleştirildi.
- 50 µL RNase içermeyen su eklenerek 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Daha sonra 13 000 g'de oda sıcaklığında 2 dakika santrifüjlendi. Kolonlardan ependorf tüplerine geçen RNA örneklerinin saflıkları ve konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre ile belirlendi ve -80°C'de muhafaza edildi.

Total RNA'ların saflık derecesi ve konsantrasyonunun belirlenmesi

Nükleik asitlerin kantitatif tayinleri pürin ve pirimidin bazlarının UV ışığı 260-280 nm'de absorbe etmelerinden dolayı spektrofotometrik olarak belirlenebilmektedir. A260/A280 oranı, saf olarak elde edilen DNA örneklerinde yaklaşık 1,8 ve RNA örneklerinde ise yaklaşık 2 olması gerekmektedir. Bu oranın altındaki değerler protein ve fenol kirliliğinin göstergesi olabilir. A549 ve HepG2 hücrelerinden izole edilen total RNA örneklerinin nanodrop spektrofotometre ile belirlenen saflık derecesi Tablo 6, 7, 8 ve 9'da verildi.

Tablo 6. A549 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC₅₀ Konsantrasyonunda Difraktik ve Vulpinik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Total RNA Saflık Derecesi ve Konsantrasyonu

Zaman	Deney Grupları	Saflık Derecesi (A260/A280)	Konsantrasyon (ng/μL)
48. saat	Kontrol 1	2,181	324,267
	Kontrol 2	2,152	345,124
	Kontrol 3	2,138	421,763
	Difraktik Asit 1	2,145	134,378
	Difraktik Asit 2	2,155	151,123
	Difraktik Asit 3	2,128	137,394
	Vulpinik Asit 1	2,110	121,278
	Vulpinik Asit 2	2,171	128,388
	Vulpinik Asit 3	2,139	125,881

Tablo 7. A549 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC₅₀ Konsantrasyonunda Evernik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Total RNA Saflık Derecesi ve Konsantrasyonu

Zaman	Deney Grupları	Saflık Derecesi (A260/A280)	Konsantrasyon (ng/μL)
24. saat	Kontrol 1	2,120	430,178
	Kontrol 2	2,114	337,221
	Evernik asit 1	2,108	441,061
	Evernik asit 2	2,117	456,377

Tablo 8. HepG2 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC₅₀ Konsantrasyonunda Difraktik ve Vulpinik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Total RNA Saflık Derecesi ve Konsantrasyonu

Zaman	Deney Grupları	Saflık Derecesi (A260/A280)	Konsantrasyon (ng/μL)
48. saat	Kontrol 1	2,115	723,78
	Kontrol 2	2,109	941,85
	Kontrol 3	2,112	410,79
	Difraktik Asit 1	2,115	231,18
	Difraktik Asit 2	2,127	255,37
	Difraktik Asit 3	2,108	165,16
	Vulpinik Asit 1	2,141	378,10
	Vulpinik Asit 2	2,145	448,65
	Vulpinik Asit 3	2,133	391,52

Tablo 9. HepG2 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC₅₀ Konsantrasyonunda Evernik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Total RNA Saflık Derecesi ve Konsantrasyonu

Zaman	Deney Grupları	Saflık Derecesi (A260/A280)	Konsantrasyon (ng/μL)
24. saat	Kontrol 1	2,124	805,92
	Kontrol 2	2,121	863,07
	Evernik asit 1	2,085	273,55
	Evernik asit 2	2,110	558,37

cDNA sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi için High-Capacity cDNA Revers Transkripsiyon Kit kullanıldı ve üretici firmanın protokolüne göre aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

- Kit içerisinde bulunan bileşenler buz üzerinde çözündürüldü.
- Steril bir mikrosantrifüj tüpü içerisine kit bileşenleri Tablo 10'da belirtilen hacimlerde eklendi.

Tablo 10. cDNA Sentezi İçin Kullanılan Bileşenler ve Hacimleri

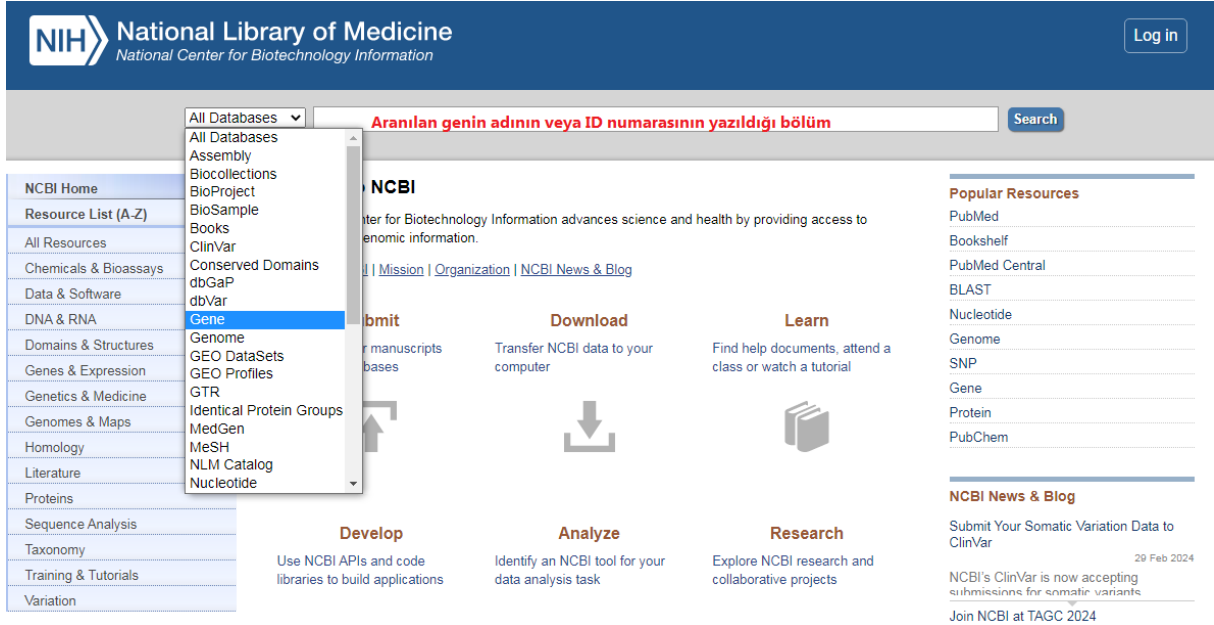
BİLEŞEN	HACİM (μL)
10XRT Buffer	2
25XdNTP Mix (100 mM)	0,8
10XRT Random Primer	2
MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1
Nükleaz-içermeyen H ₂ O	4,2

- Hazırlanan karışım buz üzerinde hafifçe karıştırıldı ve 2X RT Master Mix'ten 10 μl eklenerek minisantrifüj tüplerine konuldu.
- Total RNA örnekleri konsantrasyonları 0,02 - 2 μg arasında olacak şekilde eşitlendikten sonra her RNA örneğinden 10 μl eklenerek pipetaj yapıldı.
- Son hacmi 20 μl olan tüpler spin yapıldıktan sonra 25 °C'de 10 dk; 37 °C'de 120 dk; 85 °C'de 5 dk ve son olarak 4 °C'de ∞ olacak şekilde PCR cihazında inkübe edildi.
- Reaksiyon sonlandıktan sonra cDNA'lar Real Time PCR analizinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

Primer dizaynı

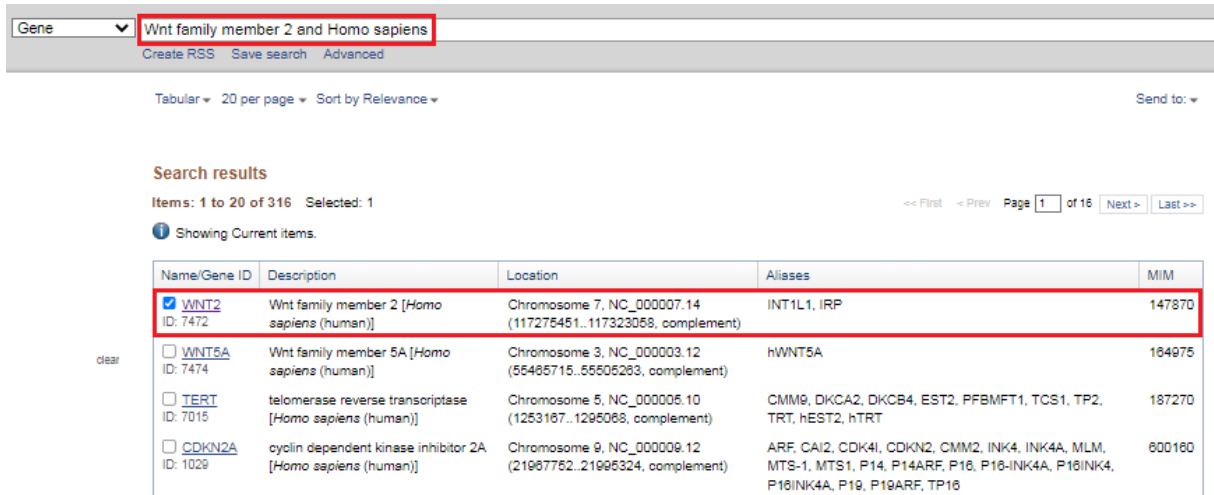
Tez kapsamında çalışılan WNT/β-KATENİN sinyal yolağı genleri olan *WNT2*, *CTNNB1*, *TCF-4*, *AXIN1*, *DVLI*, *CDK1*, *CCND1*, *MYC*, PI3K/AKT/mTOR yolağı genleri olan *PI3K*, *AKT*, *mTOR*, *PTEN* ve housekeeping gen olarak beta aktin (*β-Actin*) genlerinin

primer dizayn için National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazı kullanıldı. İlk olarak Şekil 18’de gösterildiği gibi NCBI ana sayfası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)’na gidilerek “All databases” bölümünden “Gene” seçeneği seçildi ve arama kutucuğuna gen bilgisi (kısa veya uzun adı ya da ID numarası) yazılarak “Search” butonuna tıklandı.



Şekil 18. Primer dizayn etmek için kullanılan NCBI anasayfası

Şekil 19’da gösterildiği gibi ilgili gen için organizma seçimi yapıldı. Bu tez kapsamında insan akciğer ve karaciğer kanser hücre hatları kullanıldığı için gen ismi ile birlikte “*Homo sapiens*” yazılarak Şekil 20’deki gibi ilgili gen hakkındaki bilgileri içeren sayfaya ulaşıldı.



Şekil 19. Primer dizayn etmek için kullanılan NCBI organizma seçim sayfası

Açılan sayfada gen sekans kodunu gösteren linke tıklanarak ilgili genin ayrıntılı bilgilerine ulaşıldı.

Gene

Full Report

WNT2 Wnt family member 2 [*Homo sapiens* (human)]

Gene ID: 7472, updated on 1-Mar-2024

Summary

Official Symbol WNT2 provided by HGNC
Official Full Name Wnt family member 2 provided by HGNC
Primary source HGNC:HGNC:12780
See related [Ensembl:ENSG00000105989](#) [MIM:147870](#); [AllianceGenome:HGNC:12780](#)
Gene type protein coding
RefSeq status REVIEWED
Organism [Homo sapiens](#)
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as IRP; INT1L1
Summary This gene is a member of the WNT gene family. The WNT gene family consists of structurally related genes which encode secreted signaling proteins. These proteins have been implicated in oncogenesis and in several developmental processes, including regulation of cell fate and patterning during embryogenesis. Alternatively spliced transcript variants have been identified for this gene. [provided by RefSeq, Jul 2008]

Şekil 20. İlgili genin nükleotit sekansına ulaşılabilir bağlantı linklerinin bulunduğu NCBI sayfasının üst kısmı

mRNA and Protein(s)

1. [NM_003391.3](#) → [NP_003382.1](#) protein Wnt-2 precursor
[See identical proteins and their annotated locations for NP_003382.1](#)

Status: REVIEWED

Description	Transcript Variant: This variant (1) represents the longer transcript.
Source sequence(s)	AC006326 , BC078170
Consensus CDS	CCDS5771.1
UniProtKB/Swiss-Prot	A4D0V1 , P09544 , Q75N05 , Q9UDP9
UniProtKB/TrEMBL	AQA384MDX3
Related	ENSP00000265441.3 , ENST00000265441.8

Conserved Domains (1) [summary](#)

pfam00110	wnt; wnt family
Location:43 - 349	

Şekil 21. İlgili genin nükleotit sekansına ulaşılabilir bağlantı linklerinin bulunduğu NCBI sayfasının alt kısmı

FASTA sekmesine (Şekil 22) tıklanarak ilgilenilen genin nükleotit sekansına FASTA formatına ulaşıldı (Şekil 23).

GenBank

Homo sapiens Wnt family member 2 (WNT2), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_003391.3
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to: \[v\]](#)

LOCUS NM_003391 3856 bp mRNA linear PRI 10-FEB-2024
DEFINITION Homo sapiens Wnt family member 2 (WNT2), transcript variant 1, mRNA.
ACCESSION NM_003391
VERSION NM_003391.3
KEYWORDS RefSeq; MANE Select.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

Şekil 22. İlgili genin nükleotit sekansına ulaşılabilir bağlantı linkinin bulunduğu NCBI sayfası

FASTA ▾

Homo sapiens Wnt family member 2 (WNT2), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_003391.3

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NM_003391.3 Homo sapiens Wnt family member 2 (WNT2), transcript variant 1, mRNA
GCTTCTGCTCTGGGCACGCATGGCGCCCGCACACGGAGTCTGACCTGATGCAGACGCAAGGGGTTAATA
TGAACGCCCCCTCTCGGTGGAATCTGGCTCTGGCTCCCTCTGCTCTTGACCTGGCTACCCCCGAGGTCAA
CTCTTATGGTGGTACATGAGAGCTACAGGTGGCTCCTCCAGGGTGATGTGCGATAATGTGCCAGGCCTG
GTGAGCAGCCAGCGGTCAGCTGTGTACACCAGCATCCAGATGTGATGCGTGCCATTAGCCAGGGCGTGGCCG
AGTGGACAGCAGAATGCCAGCACCAGTTCGCCAGCACCCTGGAATTGCAACACCTGGACAGGGATCA
CAGCCTTTTTGGCAGGGTCTACTCCGAAGTAGTCGGGAATCTGCCTTTGTTATGCCATCTCCTCAGCT
GGAGTTGTATTTGCCATCACAGGGCCTGTAGCCAAGGAGAAGTAAATCCTGTTCTGTGATCAAAGA
AGATGGGAAGCGCAAGGACAGCAAAGGCATTTTGTATTGGGGTGGCTGCAAGTATAACATTGACTATGG
GATCAAATTTGCCCGCGCATTTGTGGATGCAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGATGCCAGAGCCCTGATGAAT
CTTCACAACAACAGAGCTGGCAGGAAGGCTGTAAAGCGGTTCTTGAACAAGAGTGAAGTGCACAGGGG
TGAGCGGCTCATGTAATCTCAGGACATGCTGGCTGGCCATGGCCGACTTCAGGAAAACGGGCGATTATCT
CTGGAGGAAGTACAATGGGGCCATCCAGGTGGTCAAGCAAGGATGGCACAGGTTTCACTGTGGCTAAC
GAGAGGTTTAAAGCAACGAAAAATGACCTCGTGTATTTGAGAATTCTCCAGACTACTGTATCAGGG
ACCGAGAGGCAGGCTCCCTGGGTACAGCAGGCCGTGTGTGCAACCTGACTTCCCGGGGCATGGACAGCTG
TGAAGTCATGTGCTGTGGGAGAGGCTACGACACCTCCCATGTACCCGGATGACCAAGTGTGGGTGTAAG
TTCCACTGGTGTGCGCCGTGCGCTGTGCAAGACTGCTGGAAGCTCTGGATGTGCACACATGCAAGGCC
CAAAGAACGCTGACTGGACAACCGCTACATGACCCAGCAGGCGTCAACATCCACCTTCCCTTACAAG
GACTCCATTGGATCTGCAAGAACACTGGACCTTTGGGTTCTTCTGGGGGATATTTCTAAGGCATGTG
GCCTTTATCTCAACGGAAAGCCCTCTTCTCCCTGGGGGCCAGGATGGGGGGCCACACGCTGCACC
TAAAGCTACCTTATCTATCCATCTCCTGGTGTCTGCAAGTCTCCCTCCTGGCGAGTTCTCTTTG
GAAATAGCATGACAGGCTGTTGAGCGGGAGGGTGGTGGGCCAGACCCTGTCTCCACCCACCTTGACG
TTTCTTCTTCTAGAGCAGTGGCCAGCAGAAAAAAGTGTCTCAAAGGAGCTTCTCAATGCTCTCC
CACAAATGGTCCCAATTAAGAAATCCATACTTCTCTCAGATGGGAACAGTAAAGAAAGCAGAATCAACT
```

Şekil 23. İlgili genin sekansının FASTA formantında gösterildiği NCBI sayfası

Genlere ait ekspresyon seviyesini belirlemek amacıyla <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> programı kullanılarak primer dizaynı yapıldı. Primer dizayn edilirken aşağıda belirtilen konulara dikkat edildi;

- Adenin veya Timin bazlarıyla ile başlayıp guanin veya sitozin bazları ile sonlanmalıdır.
- Primerlerin GC içeriği %35-65 arasında olmalıdır.
- Sol ve sağ primerlerin bağlanma sıcaklıkları arasındaki fark en fazla 0,5 kadar olmalıdır.
- Ürün boyutu yaklaşık olarak 60-150 baz çifti, arasında olmalıdır.
- Primerlerin kendi aralarındaki spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla 4 veya daha fazla baz tekrarlarının olmamasına dikkat edilmelidir.

Şekil 24'de gösterildiği gibi ilgili genin dizilimi kutucuğa yapııştırıldı. Ardından sol ve sağ primer işaretlendi. Dizayn edilmek istenen ilgili gen ile ilgili istenen özellikler "General Setting" kısmına girildi. Daha sonra "Pick Primer" sekmesine tıklanarak verilen seçeneklerden uygun olan primer dizisinin sipariş edilmek üzere seçimi yapıldı. İlgili genler için dizayn edilen primer listesi Tablo 11'de verildi.

Load server settings: Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Activate Settings

Task:

Main General Settings Advanced Settings Internal Oligo Penalties Advanced Seq.

Sequence Id:

Paste template sequence below or upload sequence file:

```
GCTTCTGCTCTGGGCACGCATGGCCGCCACACGGAGTCTGACCTGATGCAGACGCAAGGGGTTAATA
TGAACGCCCTCTCGGTGGAACTGGCTCTGGCTCCCTCTGCTTTGACCTGGCTCACCCCGAGGTCAA
CTCTTCATGGTGGTACATGAGAGCTACAGGTGGCTCCTCCAGGGTATGTGCGATAATGTGCCAGGCTG
GTGAGCAGCCAGCGGCAGCTGTGTACCCGACATCCAGATGTGATGCGTGCCATTAGCCAGGGCGTGGCCG
AGTGGACAGCAGAATGCCAGCACCAGTTCCGCCAGCACCCTGGAAATGCAACACCCCTGGACAGGGATCA
CAGCCTTTTGGCAGGGTCTACTCCGAAAGTAGTCGGGAATCTGCCTTTGTTATGCCATCTCCTCAGCT
GGAGTTGTATTGCCATCACCAGGGCTGTAGCCAAAGGAAAGTAAATCCTGTTCCTGTGATCCAAAGA
AGATGGGAAGCGCAAGGACAGCAAAGGCATTTTGTATGGGGTGGCTGCAGTGATAACATTGACTATGG
GATCAAATTTGCCCGCGCATTGTGGATGCAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGATGCCAGAGCCCTGATGAAT
CTTCAACAACAAGAGCTGGCAGGAAGGCTGTAAGCGGTCTTGAACAAGAGTGCAAGTGCCACGGGG
TGAGCGGCTCATGTACTCTCAGGACATGCTGGCTGGCCATGGCCGACTTCAGGAAAACGGGCGATTATCT
CTGGAGGAAGTACAATGGGGCATCCAGTGGTATGAACAGGATGGCACAGGTTTCACTGTGGCTAAC
```

Mark selected region:

Şekil 24. Primer ve prob dizaynında kullanılan veri tabanı

Main **General Settings** Advanced Settings Internal Oligo Penalties Advanced Seq. Results

Product Size Ranges:

Primer Size:

Primer Tm:

Primer Bound%:

Primer GC%:

Concentration of monovalent cations: Not the concentration of oligos in the reaction mix!

Concentration of divalent cations:

DMSO Concentration:

DMSO Factor:

Şekil 25. İlgili gen için dizayn edilen primer dizilerinin özelliklerinin girildiği sekme

Left Primer 1:

Start: 602 Length: 20 bp Tm: 60.0 C B: 94.548 % GC: 55.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 11.0 HP: 38.7 3' Stab: 4.7 Penalty: 0.034

Right Primer 1:

Start: 1106 Length: 20 bp Tm: 60.0 C B: 94.750 % GC: 55.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 8.0 HP: 34.7 3' Stab: 3.9 Penalty: 0.036

Şekil 26. İlgili gen için dizayn edilen primer dizilerinin özellikleri

İlgili gen için dizayn edilen primerlerin bağlanma spesifiklikleri yani başka genlerle homolojisinin olup olmadığı <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> programı yardımıyla Şekil 27'de gösterildiği gibi kontrol edildi ve Şekil 28'deki gibi blast sonuçlarına ulaşıldı.

Standard Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTn programs search nucleotide databases using a nucleotide query, more...

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) Query subrange [?](#)

AAGGAAAGGATGCCAGAGCC From To

Or, upload file Dosya seçilmedi [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database Standard databases (nr etc.): rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus

New Experimental databases [Try experimental taxonomic nt databases](#) For more info see [What are taxonomic nt databases?](#)

Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

Organism exclude [?](#)

Optional Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

Şekil 27. Dizayn edilen primerlerin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası

BLAST® » blastn suite » results for RID-Y8WHTZWZ013 Home Recent Results Saved Strategies Help

[< Edit Search](#) Save Search Search Summary [v](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

i Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence. Your search is limited to records that include: Homo sapiens (taxid:9606)

Job Title **Nucleotide Sequence**

RID [Y8WHTZWZ013](#) Search expires on 03-04 19:51 pm [Download All](#) [v](#)

Program BLASTN [?](#) [Citation](#) [v](#)

Database nt [See details](#) [v](#)

Query ID lcl|Query_6003709

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 20

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Descriptions **Graphic Summary** Alignments Taxonomy

[hover to see the title](#) [click to show alignments](#) Alignment Scores < 40 40 - 50 50 - 80 80 - 200 >= 200 [?](#)

100 sequences selected [?](#)

Distribution of the top 1140 Blast Hits on 100 subject sequences

Query

1 4 8 12 16 20

Şekil 28. Dizayn edilen primerlerin BLAST sonuç sayfası

Tablo 11. Tez Kapsamında Real Time PCR ile Gen Ekspresyon Profillerine Bakılan Genler İçin Dizayn Edilen Primerlerin Listesi

Gen Adı	Gen Erişim Numarası	Primer	Sekans Dizisi (5'→3')	Reaksiyon Sıcaklığı (°C)
<i>β-Aktin</i>	NM_001101.5	Forward	TGCTATCCCTGTACGCCTCT	59,86
		Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGA	59,86
<i>WNT2</i>	NM_003391.3	Forward	AAGGAAAGGATGCCAGAGCC	60
		Reverse	TGCACATCCAGAGCTTCCAG	60
<i>AXIN1</i>	NM_003502.4	Forward	CGTCTGGAGGAGGAAGAAAAGAG	60,4
		Reverse	CTCTGCGATCTTGTCTCTGTCT	59,6
<i>DVL1</i>	NM_001330311.2	Forward	GATGGACAACGAGACAGGCA	60
		Reverse	CGGCATCGTCATTGCTCATG	60
<i>CTNNB1</i>	NM_001330729.2	Forward	GCTTGGTTCACCAGTGGATT	60
		Reverse	GTTGAGCAAGGCAACCATTT	60,1
<i>TCF-4</i>	NM_001243226.3	Forward	GAGGCCAAGGTTTGTGTGAT	59,97
		Reverse	CACTGCTCACAGGAGGTGAA	60,02
<i>CDK1</i>	NM_001320918.1	Forward	GGCTCTGATTGGCTGCTTTG	59,83
		Reverse	GGTAGATCCGCGCTAAAGGG	60,32
<i>MYC</i>	NM_001354870.1	Forward	TACAACACCCGAGCAAGGAC	61,1
		Reverse	GAGGCTGCTGGTTTTCCACT	61,7
<i>CCND1</i>	NM_053056.3	Forward	GGCGGAGGAGAACAACAGA	62,6
		Reverse	CTCCTCAGGTTTCAGGCCTTG	62,3
<i>PI3KCA</i>	NM_006218.4	Forward	CCCCTCCATCAACTTCTTCA	60,04
		Reverse	ATGCCGATAGCAAAACCAAT	59,44
<i>AKT</i>	NM_005163.2	Forward	TTCTATGGCGCTGAGATTGTGT	62,1
		Reverse	GCCGTAGTCATTGTCCTCCAG	62
<i>mTOR</i>	NM_004958.4	Forward	GCAGATTTGCCAACTATCTTCGG	64,2
		Reverse	CAGCGGTAAGTGTCCCCTG	64
<i>PTEN</i>	NM_000314.8	Forward	TAGGGGAATGGAGGGAATG	59,69
		Reverse	CGCAAACAACAAGCAGTGA	59,60

Real Time PCR analizi

Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla Real Time PCR analizi yapıldı. Analiz için liken asitleriyle muamele edilen insan akciğer ve karaciğer kanser hücre hatlarından ve liken asitleriyle muamele edilmeyen kontrol gruplarından izole edilmiş olan total RNA'dan revers transkriptaz enzimi yardımıyla hazırlanan cDNA'lar kullanıldı. Syber Green yöntemi ile liken asitlerinin *WNT2*, *AXIN1*, *DVLI*, *CTNBN1*, *CDK1*, *TCF4*, *MYC*, *CCND1*, *PI3KCA*, *AKT*, *mTOR* ve *PTEN* genlerinin kantitatif ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri belirlendi. Sonuçlar β -Aktin housekeeping geni ile normalize edildi. Real Time PCR karışımı Tablo 12'de ve sıcaklık döngüsü Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 12. Real Time PCR İçin Bir Tüp İçerisindeki Karışım

Bileşen	Miktar (μ L)	Son Konsantrasyon
Syber Green Master Mix	10	1X
ddH ₂ O	6	-
Forward Primer	1	0,5 μ M
Reverse Primer	1	0,5 μ M
cDNA	2	10 ng
Total Hacim	20	

Tablo 13. SYBR Green Real Time PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	Süre (s)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	30	1
Denatürasyon	95	5	
Primer Bağlanma Basamağı	57	30	40
Primer Uzama Basamağı	72	20	

Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Real Time PCR analizinin ardından kontrol ve muamele grupları için elde edilen CT değerlerine göre Livak Metodu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) ile istatistiksel analiz yapıldı. GraphPad Prism Software istatistik programı kullanılarak sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. One Way ANOVA ve Unpaired t-testi ile p değerleri belirlendi: $p > 0,05 = ns$ (not significant) önemsiz, $p < 0,05 = *$ (significant) önemli, $p < 0,01 = **$ (very significant) çok önemli, $p < 0,001 = ***$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

Western Blot Yöntemi ile Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi

A549 ve HepG2 hücrelerinden protein homojenatının hazırlanması

- İnsan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanser hücre hatları hücre kültürüne uyumlu steril petri kaplarının her birine 125 000 hücre/mL olacak şekilde 8'er mL

ekildi. Hücrelerin yüzeye yapışmaları için 37°C'de %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde %60-70 doluluğa ulaşınca kadar inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrasında besiyeri uzaklaştırıldı ve petrilere 2 mL DPBS tamponu ile yıkandı, ardından DPBS tamponu aspire edildi.
- Daha önce belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarına göre taze komplet besiyerinde hazırlanan 10 mL liken asitleri muamele grubu olarak steril petrilere eklendi. 37 °C'de %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde belirlenmiş olan IC₅₀ değerlerine göre 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol grubuna ise yalnızca komplet besiyeri eklendi.
- İnkübasyon sonrasında besiyeri aspire edildi ve soğuk DPBS tamponu ile yıkandı. Buz üzerine konulan her bir petri kabına 400 µL 1X lizis tamponu ilave edildi. 1 mM Fenilmetilsülfonil Florid (PMSF) içeren RIPA buffer lizis tampon olarak kullanıldı.
- 5 dk buz üzerinde bekletildi ve hücre kazıyıcıları (cell scraper) ile hücreler petrilere kazınarak 1,5 mL'lik ependorf tüplerde toplandı. Vortekslendikten sonra +4 °C'de sonikatörde kısa süreli parçalama yapıldı.
- 10 dakika boyunca +4°C'de 14 000 g'de santrifüjleme yapıldı ve süpernatant dikkatli bir şekilde alınarak alikuatlara ayrıldı. Daha sonraki çalışmalar için kullanılmaya kadar -80 °C'de saklandı.

Bradford (Coomassie Blue) protein tayini

Bradford yöntemi negatif yüklü Coomassie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyası kullanılarak homojenat veya hemolizat içerisinde bulunan total proteinin kantitatif miktarını belirlemek için kullanılır. Bu boya proteinler üzerindeki pozitif yüklü aminoasitlere bağlanarak kırmızıdan maviye renk değişimini sağlamaktadır. Oluşan mavi rengin şiddeti numunedeki protein konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Bu yöntem ile boya bağlı protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Ancak yalnızca absorbans değerlerinin bilinmesi miktar hakkında pek bilgi vermez. Kantitatif miktarı belirlemek amacıyla protein konsantrasyonu belirli aralıklar ile artan ve karşılaştırma yapılabilecek bir protein standart çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltinin absorbans değerleri ölçülerek değerlere göre bir standart grafik çizilir. Ticari olarak en yaygın kullanılan protein standartı sığır serum albuminidir (BSA). Çizilen grafikte, derişimi bilinmeyen proteinlerin absorbans değerleri yerine konularak ilgili proteinlerin derişimleri hesaplanır.

Liken asitleriyle muamele edilmeyen (kontrol grupları) ve muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarından elde edilen homojenatlardaki

protein tayini için Bradford (Coomassie Blue) yöntemi Tablo 14'teki protokole göre uygulandı. Protokole uygun şekilde pipetlenen deney tüpleri vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilerek 595 nm'de absorban ölçümü yapıldı.

Tablo 14. Bradford Protein Tayini Deney Protokolü

Numune	Coomasie Blue Boyası (µL)	dH ₂ O (µL)	Homojenat (µL)
Kör	4900	100	-
Örnek	4900	90	10

Tablo 15. A549 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC₅₀ Dozunda Difraktaik ve Vulpinik Asidin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proteinlerin 595 nm'de Verdikleri Absorbans ve Protein Miktarları

Gruplar	595 nm	mg/mL
Kontrol	0,330	3,88
Kontrol	0,345	4,58
Kontrol	0,347	4,61
Difraktaik Asit	0,160	2,12
Difraktaik Asit	0,165	2,19
Difraktaik Asit	0,172	2,28
Vulpinik Asit	0,204	2,72
Vulpinik Asit	0,203	2,69
Vulpinik Asit	0,208	2,76

Tablo 16. A549 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC₅₀ Dozunda Evernik Asit Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proteinlerin 595 nm'de Verdikleri Absorbans ve Protein Miktarları

Gruplar	595 nm	mg/mL
Kontrol	0,253	3,36
Kontrol	0,273	3,63
Evernik Asit	0,373	4,96
Evernik Asit	0,207	2,75

Tablo 17. HepG2 Hücre Hattı İçin Belirlenen IC₅₀ Dozunda Difraktaik ve Vulpinik Asidin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proteinlerin 595 nm’de Verdikleri Absorbans ve Protein Miktarları

Gruplar	595 nm	mg/mL
Kontrol	0,444	5,90
Kontrol	0,483	6,42
Kontrol	0,481	6,39
Difraktaik Asit	0,230	3,05
Difraktaik Asit	0,236	3,13
Difraktaik Asit	0,233	3,09
Vulpinik Asit	0,187	2,48
Vulpinik Asit	0,160	2,12
Vulpinik Asit	0,172	2,28

Tablo 18. HepG2 Hücre Hattı için Belirlenen IC₅₀ dozunda Evernik Asidin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proteinlerin 595 nm’de Verdikleri Absorbans ve Protein Miktarları

Gruplar	595 nm	mg/mL
Kontrol	0,264	3,51
Kontrol	0,273	3,56
Evernik Asit	0,373	4,96
Evernik Asit	0,428	5,69

SDS Jelinin Hazırlanması ve Yüklenmesi

Deneyin amacı ve kullanılan ilgili proteinin moleküler ağırlığına göre jel yüzdesi belirlendikten sonra proteinlerin molekül büyüklüğüne göre fragmentlerine ayrıldığı ayırma jeli (Tablo 19) ve numunenin yüklendiği yükleme jelinden (Tablo 20) oluşan SDS poliakrilamid jeli hazırlandı.

- Jele yükleme yapılmadan önce her bir örneğe, son hacim 15 µL olacak şekilde, 1X SDS-PAGE yükleme tamponu ve 1:50 oranında β-merkaptotanol eklendi.
- Örnekler 95 °C ısıtma blokunda 10 dk denatüre edildikten sonra 10 dk buz üzerinde bekletildi.
- Denatüre olan örnekler yükleme jeline yüklendikten sonra 80 Volta yaklaşık 15 dakika yürütüldü.
- Örneklerin ayırma jeline geçtiği görüldüğünde elektroforez 150 Volta çıkarıldı ve 60 dakika boyunca yürütüldü.

Tablo 19. SDS-PAGE İçin Kullanılan Ayırma Jeli Değerleri

Jel Yüzdesi	% 8 (mL)	% 9 (mL)	% 10 (mL)	% 12 (mL)	% 14 (mL)
Didestile Su	6,9	6,45	5,9	4,9	3,9
Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	4	4,5	5	6	7
Tris pH:8,8 (1,5M)	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
SDS (%10)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
APS (%10)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED	0,009	0,075	0,006	0,006	0,006
Toplam	15	15	15	15	15

Tablo 20. SDS-PAGE İçin Kullanılan Yükleme Jeli Değerleri

Toplam	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
Didestile Su	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4
Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83
Tris pH:6,8 (1M)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63
SDS (%10)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
APS (%10)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005

Jeldeki proteinlerin membrana transfer edilmesi (blotlama), bloklanması ve görüntülenmesi

Homojenattaki proteinler SDS poliakrilamid jeli üzerinde moleküler ağırlıklarına göre fragmentlere ayrılmasının ardından blotlama cihazı ile PVDF (polyvinylidene difluoride) membrana transfer edildi. Blotlama için aşağıdaki prosedür takip edildi:

- Jel boyutunda kesilen PVDF membran kullanılmadan önce 5 dk metanol ile muamele edildi.
- Jel ve membran 5'er dk 1X Transfer Buffer ile muamele edildi.
- Blotlama cihazı içerisine sıra ile 1 parça blotlama kağıdı, membran, jel ve 1 parça blotlama kağıdı üst üste konularak 2,5 Amper, 25 Volt'da 7 dk boyunca proteinler transfer edildi.
- Blotlamanın ardından membran 5 dk 1X TBST ile yıkandı.
- Membran oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklama çözeltisi (1X TBST ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu veya BSA) ile muamele edildi.
- Membran 4°C'de 1 gece bloklama çözeltisi içerisinde seyreltilerek hazırlanmış primer antikorlar ile inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından membran oda sıcaklığında 5 kez 5'er dakika 1X TBST ile yıkandı.
- Yıkama sonrasında membran oda sıcaklığında 1 saat bloklama çözeltisi içerisinde seyreltilerek hazırlanmış sekonder antikorlar ile inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun sonrasında membran oda sıcaklığında 5 kez 5'er dakika 1X TBST ile yıkandı.
- Antikorum kimyasal sinyal oluşturması için ECL reagent substratları (BIORAD, Clarity Max Western ECL Substrate/Clarity™ Western ECL Substrate) kullanıldı.
- Membranın kemilüminesans görüntüsü ChemiDoc™ Imaging System cihazı kullanılarak elde edildi.

Bu tez kapsamında kullanılan antikorlara ait bilgiler Tablo 21 ve Tablo 22'de verildi.

Tablo 21. Western Blot Çalışması İçin Kullanılan Primer Antikorlara Ait Bilgiler

Birincil Antikor	Jel Yüzdesi	Bloklama Solüsyonu	Bloklama Süresi	Seyreltme Oranı	Antikor ile İnkübasyon Süresi	Proteinin Moleküler Ağırlığı (kDa)
WNT2	% 12	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:5000	+4°C'de 1 gece	40
CTNNB1	% 12	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:200	+4°C'de 1 gece	92
DVL1	% 12	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:200	+4°C'de 1 gece	85
AXIN	% 12	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:200	+4°C'de 1 gece	95
PI3K	% 10	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:200	+4°C'de 1 gece	123
AKT	% 12	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:600	+4°C'de 1 gece	56
mTOR	% 8	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:500	+4°C'de 1 gece	289
PTEN	% 12	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:200	+4°C'de 1 gece	55
β-Aktin	% 8-10-12	% 5'lik Yağsız Süt Tozu	Oda sıcaklığında 1 saat	1:1000	+4°C'de 1 gece	43

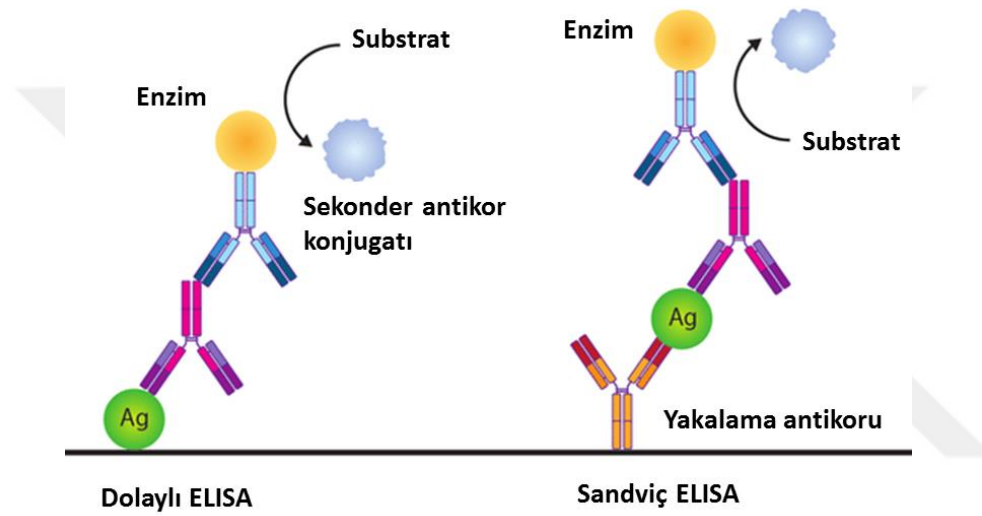
Tablo 22. Western Blot Çalışması İçin Kullanılan Sekonder Antikorlara Ait Bilgiler

Sekonder Antikor	Seyreltme Oranı	İnkübasyon Süresi
Goat anti mouse	1:10.000	Oda sıcaklığında 1 saat
Goat Anti Rabbit	1:10.000	Oda sıcaklığında 1 saat

Enzime Bağlı Immunosorbent Testi (ELISA)

Enzime bağlı immunosorbent testi (ELISA) antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesinin izlenerek, çeşitli biyolojik örneklerde antikor veya antijenin tespitini ve miktarının ölçülmesini amaçlayan bir tekniktir. ELISA testi, hassas, spesifik ve kolay olması, çoklu örnek analizine imkan vermesi, kalitatif ve kantitatif analizler için uygulanabilmesi sebebiyle laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Dolaylı ve sandviç ELISA en çok kullanılan iki yöntemdir. Dolaylı ELISA'da biri yüzeye bağlı antijene spesifik ve işaretli

olan, diğeri ise enzime bağı olan iki antikör kullanılır. İlk olarak işaretli olan primer antikör, antijen bağı ortama eklenerek belirli sürelerde inkübe edilir. Yıkama işlemleri yapıldıktan sonra, primer antiköre spesifik olan ve enzime konjuge edilmiş sekonder antikör eklenir ve yine inkübasyona bırakılır. Tekrar yıkama yapılır ve enzimin substratı ortama eklenerek elde edilen renk değişimi ile antikörler belirlenir (Lin 2015). Sandviç ELISA ise bir antijenin varlığını ve miktarını belirlemek amacıyla kullanılır. Bu yöntemde hedef antijen, biri yakalama diğeri tespit antikoru olan iki antikör arasında sandviç yapılır. Yüzeyle bağlanmış yakalama antikoru tarafından örnekte bulunan antijen bağlanır. Ardından enzime konjuge bir tespit antikoru eklenerek antijene bağlanır. Son olarak substrat eklenir ve renk değişimi gözlenir (Şekil 29) (Katsurada vd 2007).



Şekil 29. Dolaylı ve sandviç ELISA metodu (modifiye edilmiştir)(Salazar vd 2017).

İnsan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanser hücre hatlarından Kasein Kinaz I enzim aktivitesi ölçümü için BT-LAB CSNK1E Elisa Kit kullanıldı ve üretici firmanın protokolüne göre aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

Standart eğrinin hazırlanması

- İlk olarak 1200 ng/L standart stok çözeltisi oluşturmak amacıyla kit içerisinde bulunan standart solüsyonundan (2400 ng/L) 120 µL alınarak yine kit içerisinde bulunan 120 µL standart seyreltme solüsyonu ile sulandırıldı. Seyreltme yapılmadan önce standart solüsyonu (2400 ng/L) 15 dk hafifçe çalkalanarak bekletildi.
- 600 ng/L, 300 ng/L, 150 ng/L ve 75 ng/L çözeltiler hazırlamak amacıyla 1200ng/L standart stok çözeltisi seri olarak seyreltmeye devam edildi. Kite önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi Tablo 23’de verildi.

Tablo 23. Standart Çözeltilerin Seyreltilmesi İçin İzlenen Prosedür

1200 ng/L	Standart No.5	120ul Orjinal standart + 120ul Standart diluent
600 ng/L	Standart No.4	120ul Standart No.5 + 120ul Standart diluent
300 ng/L	Standart No.3	120ul Standart No.4 + 120ul Standart diluent
150 ng/L	Standart No.2	120ul Standart No.3 + 120ul Standart diluent
75 ng/L	Standart No.1	120ul Standart No.2 + 120ul Standart diluent

- Seyreltilen çözeltilerin absorbans değerleri 450 nm'de ölçülerek standart eğri hazırlandı.
- Her bir standart için ortalama absorbans değerleri, yatay (X) eksenindeki konsantrasyonlarına karşı olarak dikey (Y) ekseninde çizilerek standart eğri oluşturuldu.

Kit prosedürü

- 96 kuyucuklu plakanın standart için belirlenen kuyucuğuna 50 µL biyotinlenmiş antikor içeren standart solüsyon eklendi.
- Örnek için belirlenen kuyucuklara 40 µL örnek eklendi ve ardından 10 µL biyotinlenmiş CSNK1E antikor eklendi. Standart solüsyon antikor içerdiğinden standart kuyucuğuna CSNK1E antikor eklenmedi.
- Daha sonra hem örnek hem de standart kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklenerek iyice karıştırıldı.
- Plaka bir kapaticıyla kapatıldıktan sonra 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından kapaticı çıkarıldı ve kuyucuklar 300 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkamanın ardından 30 sn ile 1 dk bekletildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
- Yıkama sonrasında plaka kağıt havlu kullanılarak kurulandı.
- Her bir kuyucuğa 50 µL substrat çözeltisi A eklendi ve ardından her bir kuyucuğa 50 µL substrat çözeltisi B eklendi. Plaka bir yeni kapaticıyla kapatıldıktan sonra 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi ve mavi rengin sarıya dönüşümü gözlemlendi.
- Stop solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Hücre Proliferasyon Analizi (XTT) Sonuçları

Difraktaik, vulpinik ve evernik asidin insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatları üzerinde antikanser ajan olarak potansiyeli TrxR1 hedefli olarak 119Z112 nolu TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi kapsamında araştırılmıştır. Bu araştırma kapsamında liken asitlerinin, insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hatlarındaki sitotoksik etkisi doza ve zamana bağlı olarak XTT ((2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)) analizi ile incelenerek IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir (Günaydın 2022; Sulukoğlu 2022). Bu tez kapsamında ise, belirtilen çalışmada hesaplanan IC₅₀ değerleri kullanılarak insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatları difraktaik (48h), vulpinik (48h) ve evernik asit (24h) ile muamele edildi. Bahsi geçen liken asitlerinin insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatları üzerinde belirlenen IC₅₀ (µg/mL) konsantrasyonları Tablo 24'te verildi.

Tablo 24. Liken Asitlerinin (Difraktaik, Vulpinik ve Evernik Asit İnsan Akciğer (A549) ve Karaciğer (HepG2) Kanseri Hücre Hatları Üzerine Uygulanması Sonucu Belirlenen IC₅₀ (µg/ml) Konsantrasyonları (Günaydın 2022; Sulukoğlu 2022).

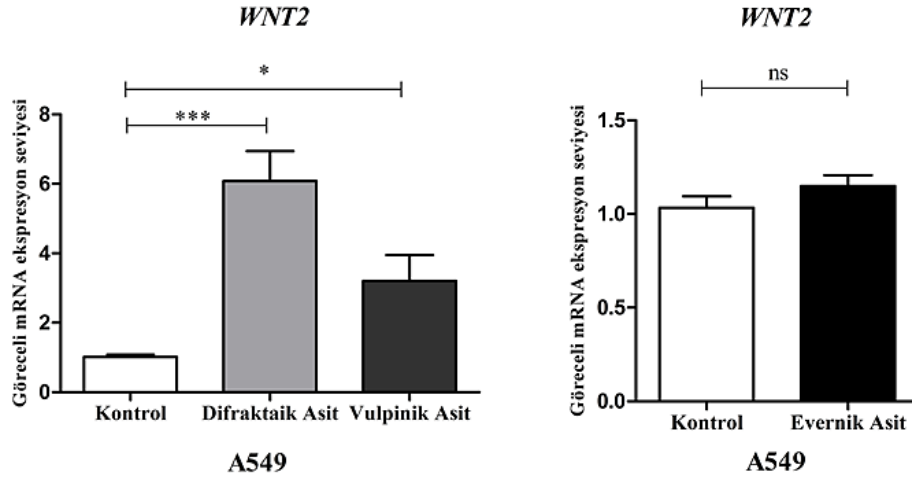
	Difraktaik asit (48. saat)	Vulpinik asit (48. saat)	Evernik asit (24. saat)
A549	46,37±1,92 µg/ mL	36,21±0,94 µg/ mL	139,09±2,78
HepG2	78,07 ± 1,60 µg/ mL	48,73 ± 1,02 µg/ mL	114,94 ± 2,25

Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları

İnsan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında difraktaik, vulpinik ve evernik asidin daha önce belirlenen etkin IC₅₀ dozlarında (Tablo 24) uygulanması sonrasında hazırlanan cDNA'lar kullanılarak, WNT/β-KATENİN ve PI3K/ AKT/mTOR yolaklarının hedef genlerinin kantitatif gen ekspresyon değişimine SYBR Green yöntemi kullanılarak Real Time PCR ile bakıldı.

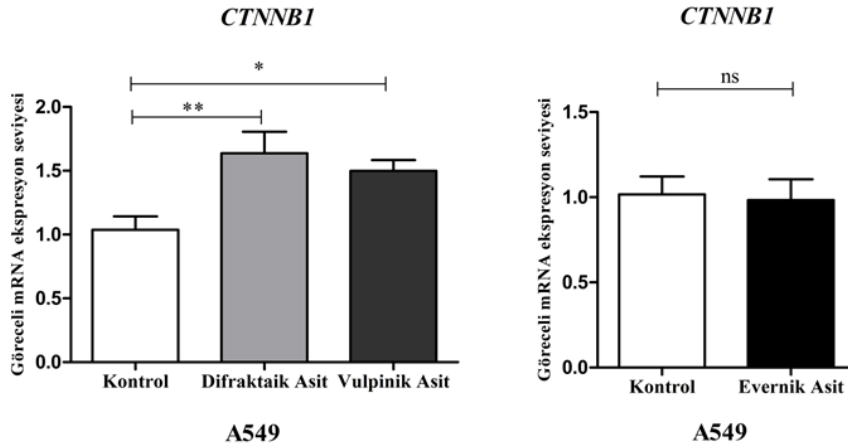
Difraktaik, Vulpinik ve Evernik Asit İle Muamele Edilen A549 ve HepG2 Kanser Hücre Hatlarında Kantitatif Gen Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Difraktaik asit (** $p < 0,001$) ve vulpinik asit ($p < 0,05$) ile 48 saat muamele edilen A549 hücrelerinde WNT/ β -KATENİN yolağına ait *WNT2* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış görüldü. Evernik asit ile 24 saat muamele edilen A549 hücrelerinde ise *WNT2* ($p > 0,05$) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.



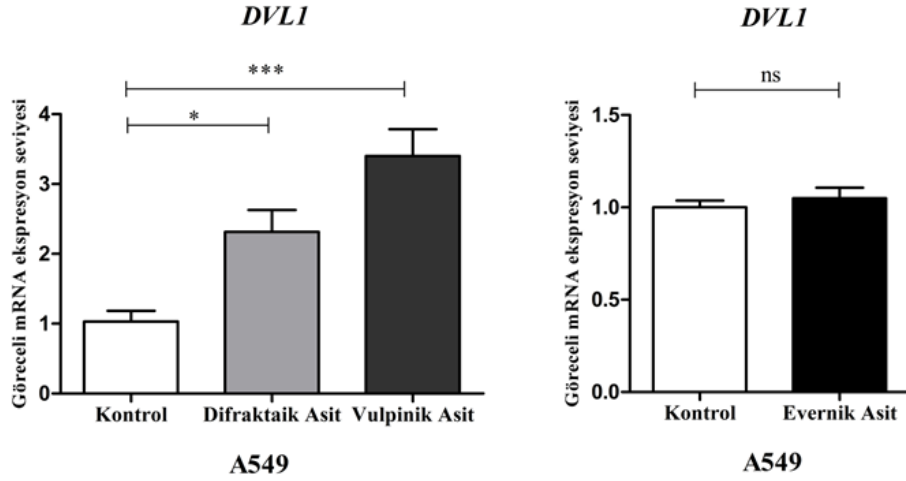
Şekil 30. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *WNT2* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (** $p < 0,01$) ve vulpinik asit ($p < 0,05$) ile 48 saat muamele edilen A549 hücrelerinde *CTNNB1* geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrole göre önemli oranda arttığı gözlemlendi. Evernik asit ile 24 saat muamele edilen A549 hücrelerinde ise *CTNNB1* ($p > 0,05$) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.



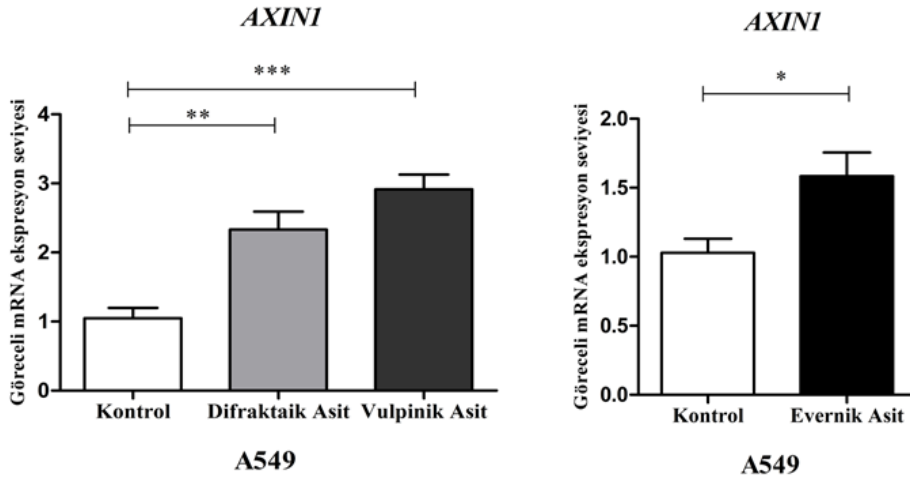
Şekil 31. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *CTNNB1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (* $p<0,05$) ve vulpinik asit (** $p<0,001$) ile 48 saat muamele edilen A549 hücrelerinde *DVLI* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış görülürken, evernik asit ile 24 saat muamele edilen A549 hücrelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$).



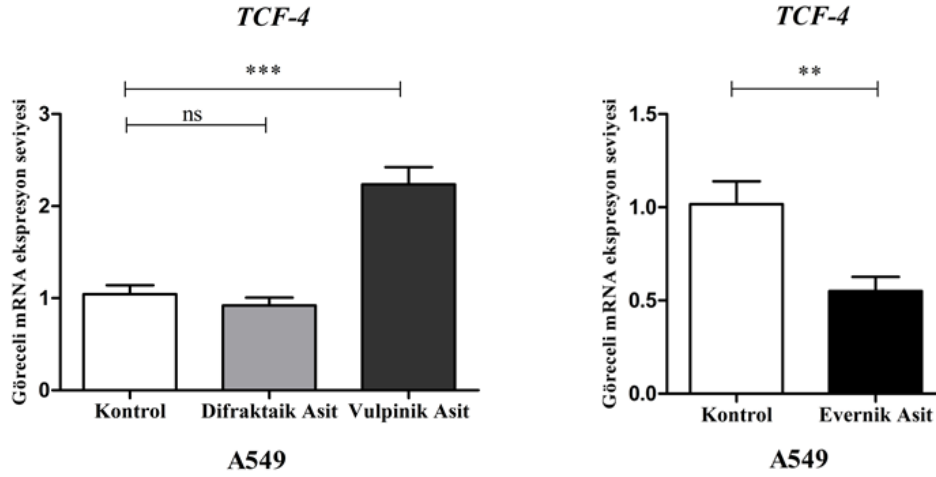
Şekil 32. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *DVLI* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (** $p<0,01$), vulpinik asit (** $p<0,001$) ve evernik asit (* $p<0,05$) ile muamele edilen A549 hücrelerinde *AXINI* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin kontrole göre arttığı gözlemlendi.



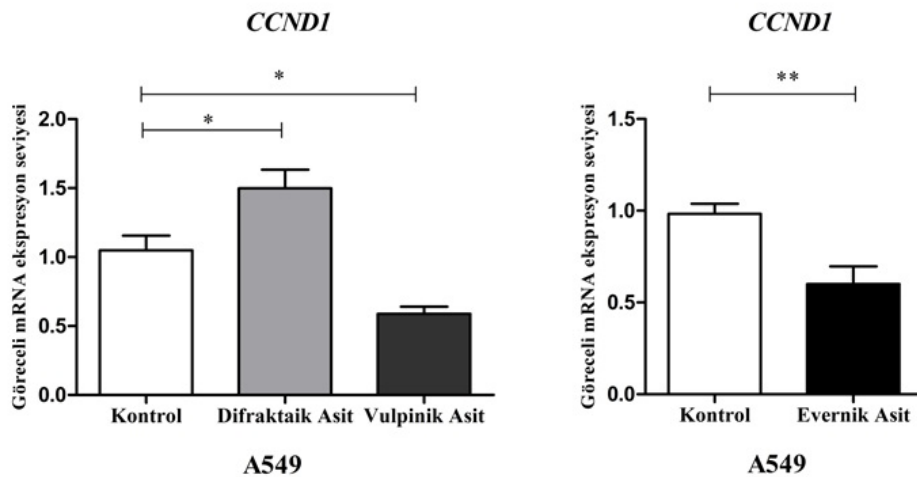
Şekil 33. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *AXINI* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde *TCF-4* ($p>0,05$) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre değişiklik görülmezken, vulpinik asitle ($***p<0,001$) muamele edilen hücrelerde arttığı görüldü. Evernik asitle muamele edilen A549 hücrelerinde *TCF-4* ($**p<0,01$) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde azalış gözlemlendi.



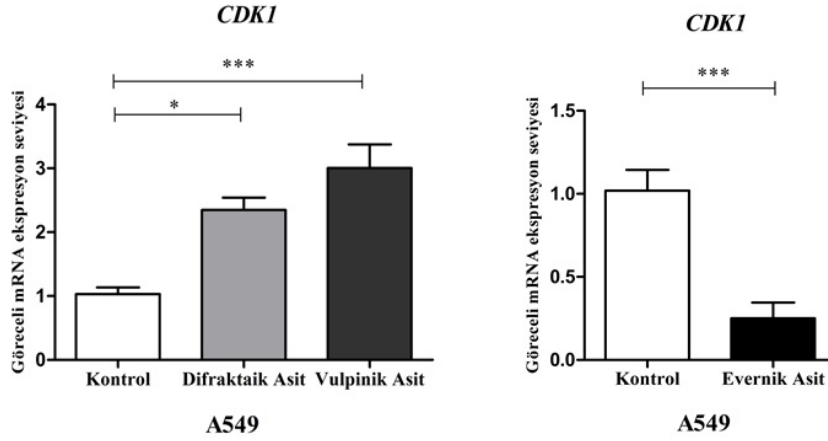
Şekil 34. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *TCF-4* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde *CCND1* ($*p<0,05$) geninin mRNA ekspresyon seviyesinin kontrole göre önemli derecede arttığı gözlemlendi. Vulpinik asit ($*p<0,05$) ve evernik asitle ($**p<0,01$) muamele edilen hücrelerde ise *CCND1* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde azalış gözlemlendi.



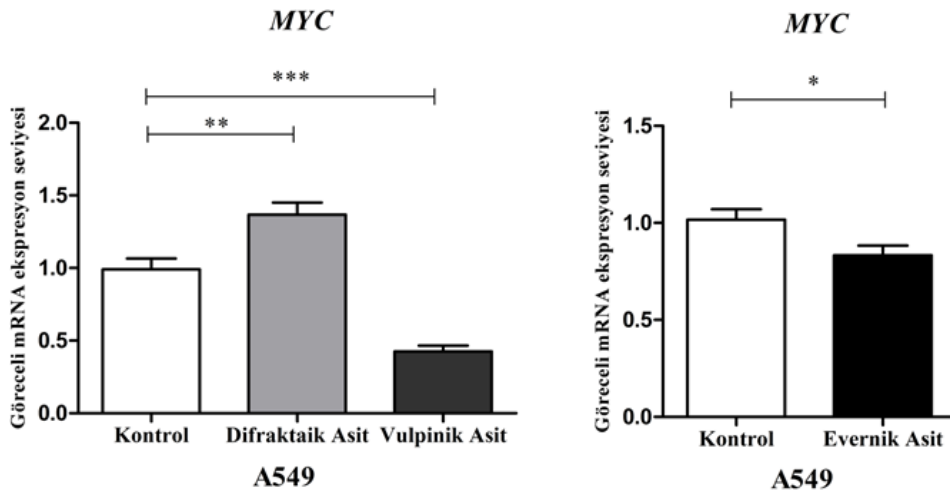
Şekil 35. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *CCND1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (*p<0,05) ve vulpinik asitle (**p<0,001) muamele edilen A549 hücrelerinde *CDKI* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış görülürken, evernik asitle (**p<0,001) muamele edilen hücrelerde azalış görüldü.



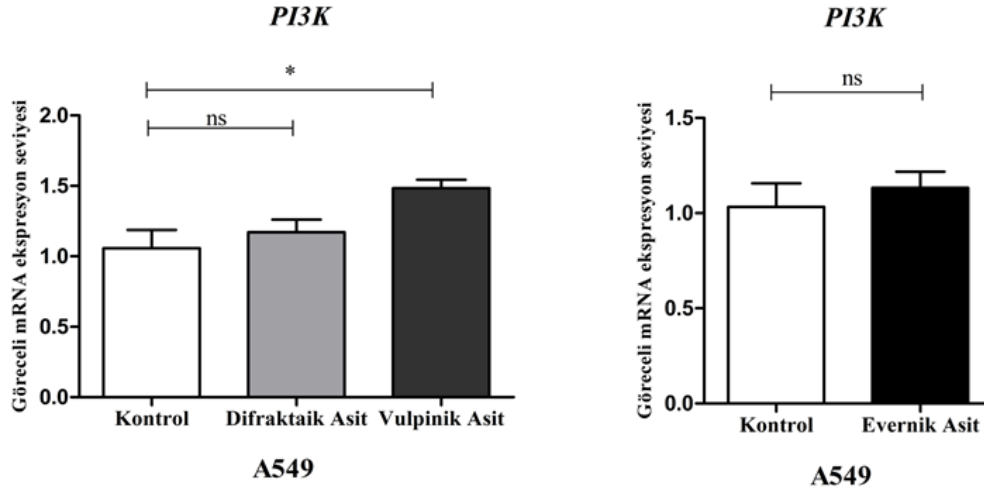
Şekil 36. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *CDKI* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde *MYC* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış görülürken (**p<0,01), vulpinik (**p<0,001) ve evernik asitle (*p<0,05) muamele edilen hücrelerde azalış görüldü.



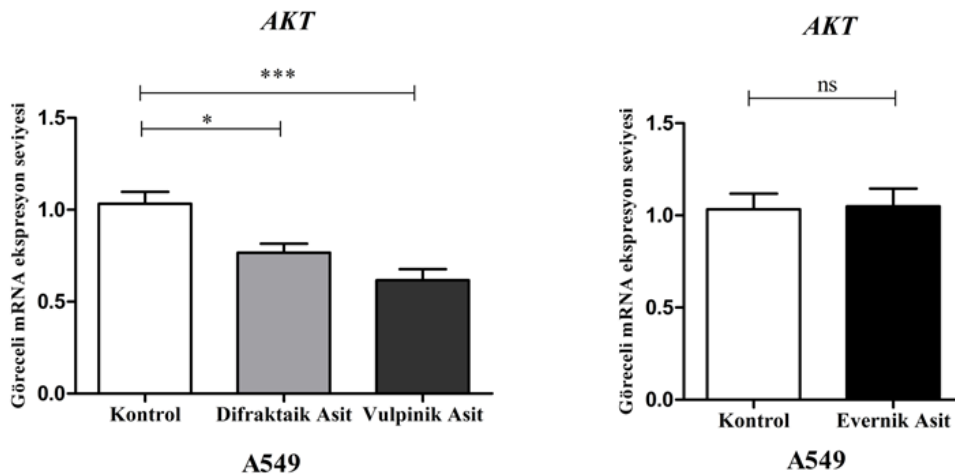
Şekil 37. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *MYC* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asitle muamele edilen A549 hücrelerinde *PI3K* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde önemli değişiklik görülmezken ($p>0,05$), vulpinik asitle muamele edilen hücrelerde artış görüldü ($*p<0,05$). Evernik asitle muamele edilen hücrelerde ise *PI3K* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$).



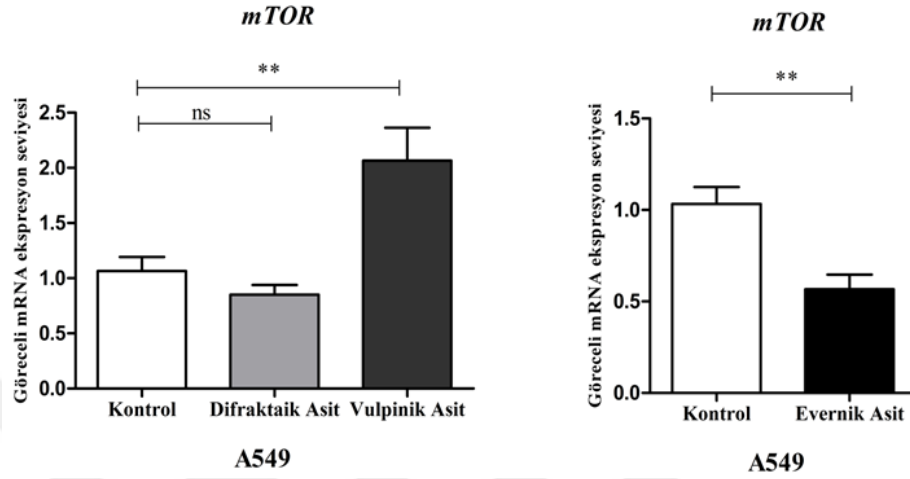
Şekil 38. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *PI3K* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik ($*p<0,05$) ve vulpinik asitle ($***p<0,001$) muamele edilen A549 hücrelerinde *AKT* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü. Evernik asit ile A549 hücrelerinde ise *AKT* geninin istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$).



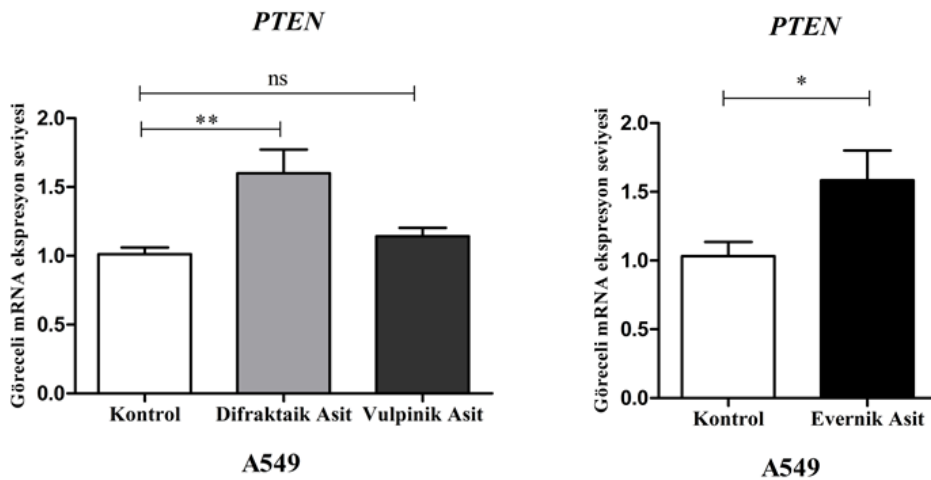
Şekil 39. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *AKT* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asitle muamele edilen A549 hücrelerinde *mTOR* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmezken ($p>0,05$), vulpinik asitle muamele edilen hücrelerde artış görüldü (** $p<0,01$). Evernik asit ile A549 hücrelerinde ise *mTOR* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde azalış görüldü (** $p<0,01$).



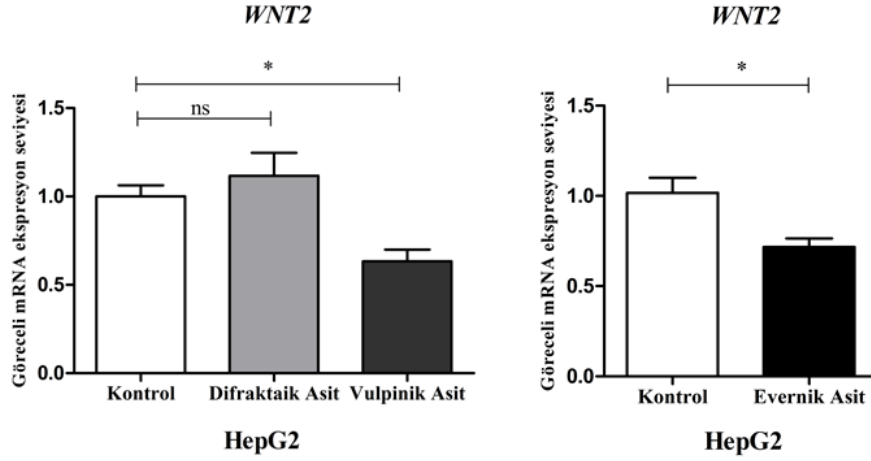
Şekil 40. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *mTOR* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (** $p<0,01$) ve evernik asit (* $p<0,05$) ile muamele edilen A549 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR yolağının negatif regülatörü olan *PTEN* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin kontrole göre arttığı gözlemlendi. Vulpinik asit ile muamele edilen hücrelerde ise *PTEN*'nin ($p>0,05$) mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.



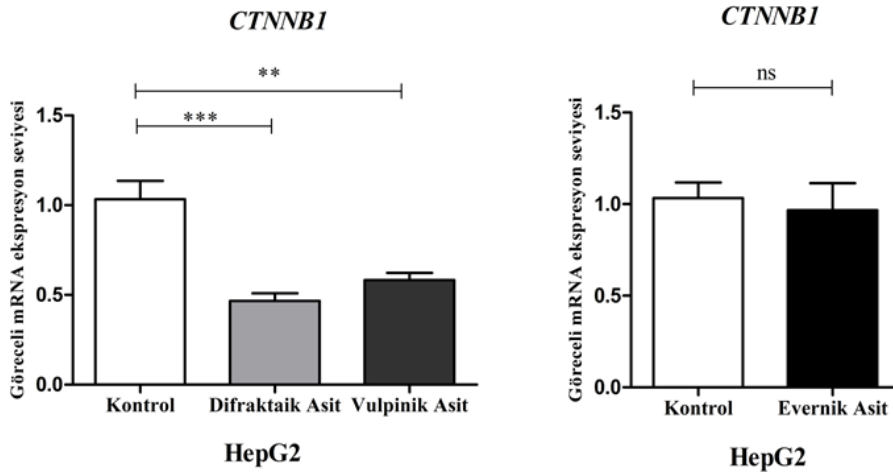
Şekil 41. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen A549 hücre hattında *PTEN* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ($p>0,05$) ile 48 saat muamele edilen HepG2 hücrelerinde WNT/ β -KATENİN yolağına ait *WNT2* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmezken, vulpinik asit ve evernik asitle muamele edilen hücrelerde *WNT2* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde azalış görüldü ($*p<0,05$).



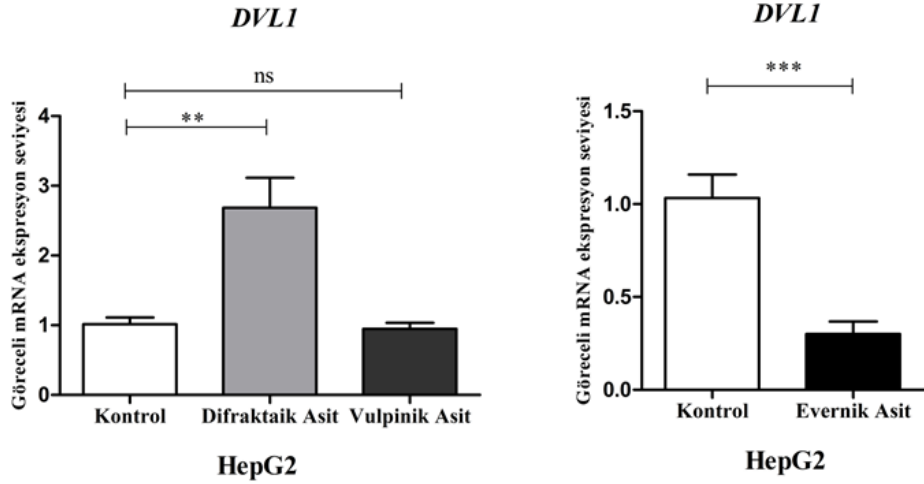
Şekil 42. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *WNT2* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ($***p<0,001$) ve vulpinik asit ($**p<0,01$) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde *CTNNB1* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre önemli oranda azalış gözlemlendi. Evernik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde ise *CTNNB1* ($p>0,05$) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.



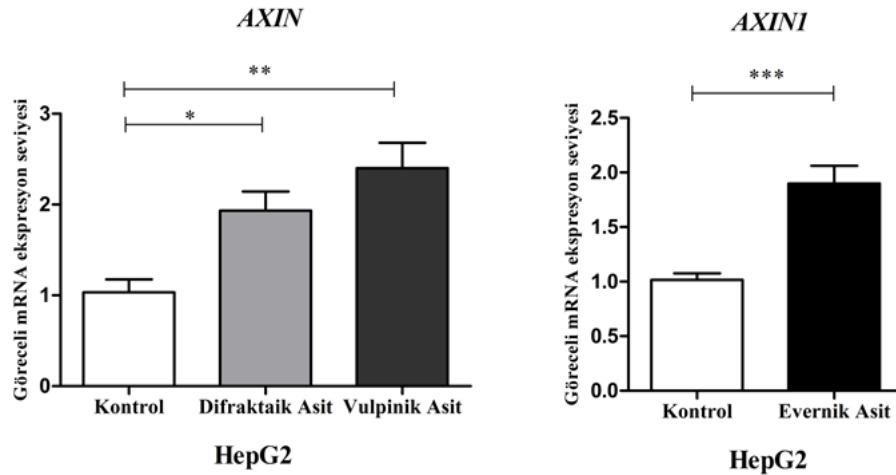
Şekil 43. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *CTNNB1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde *DVLI* (** $p < 0,01$) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış görülürken, vulpinik asitle muamele edilen hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p > 0,05$). Evernik asitle muamele edilen hücrelerde ise *DVLI* geninde önemli derecede azalış görüldü (** $p < 0,001$).



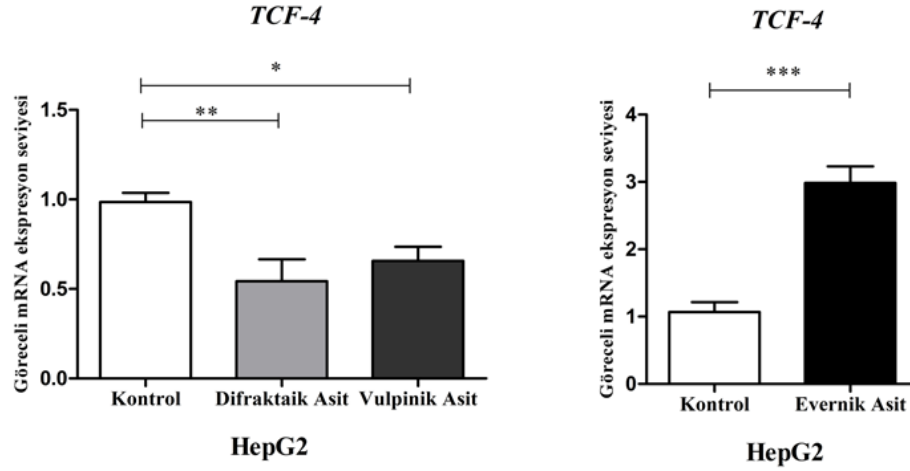
Şekil 44. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *DVLI* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ($*p < 0,05$), vulpinik asit (** $p < 0,01$) ve evernik asitle (** $p < 0,001$) muamele edilen HepG2 hücrelerinde *AXIN1* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış görüldü.



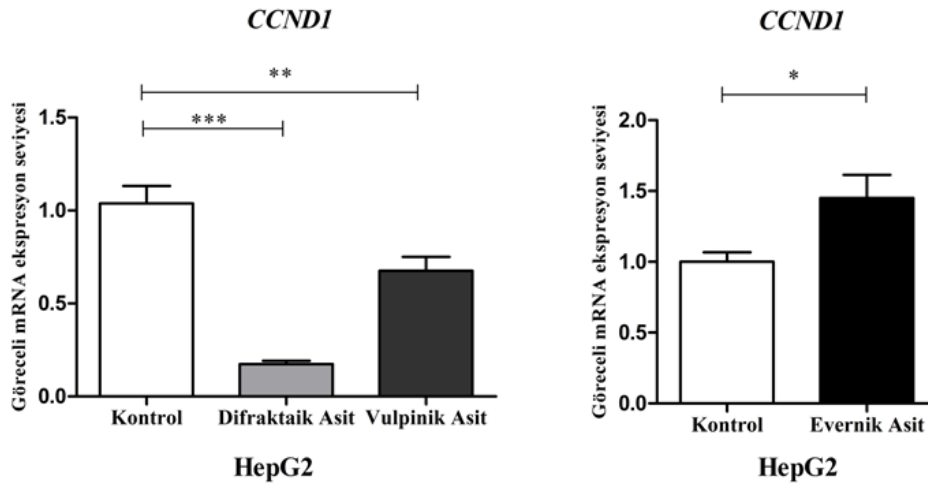
Şekil 45. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *AXIN1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (** $p < 0,01$) ve vulpinik asitle ($p < 0,05$) muamele edilen HepG2 hücrelerinde bir transkripsiyon faktörü olan *TCF-4* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış gözlemlendi. Evernik asit ile muamele hücrelerinde ise *TCF-4* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin (***) kontrole göre arttığı gözlemlendi.



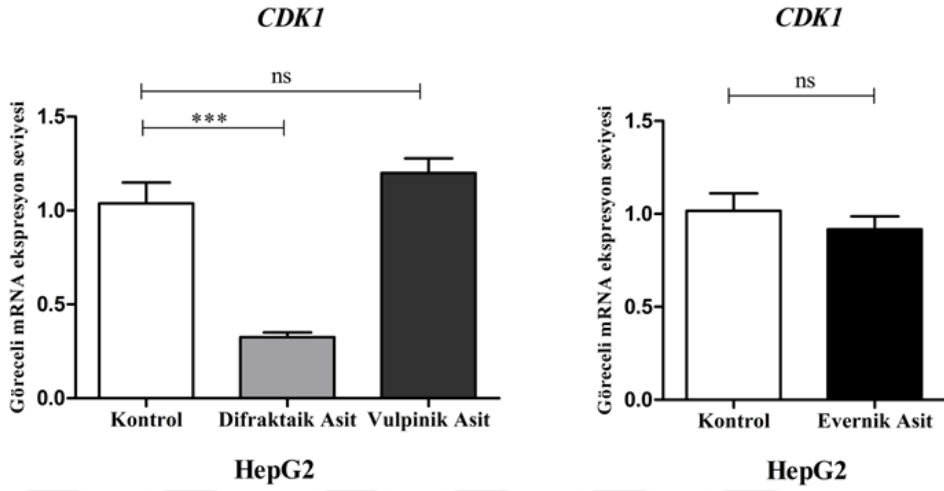
Şekil 46. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *TCF-4* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (***) ve vulpinik asitle (** $p < 0,01$) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde *CCND1* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görülürken, evernik asitle muamele edilen hücrelerde kontrole göre artış görüldü ($p < 0,05$).



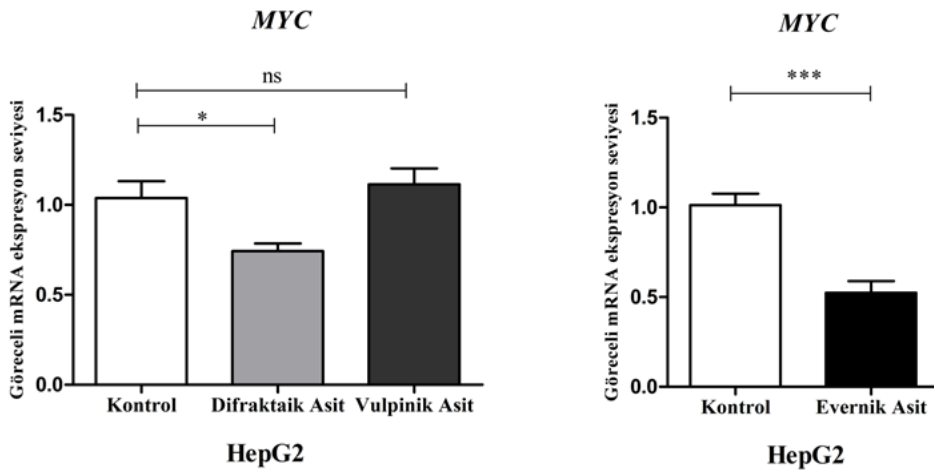
Şekil 47. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *CCND1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde *CDK1* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü (** $p < 0,001$). Vulpinik asit ve evernik asitle muamele edilen hücrelerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p > 0,05$).



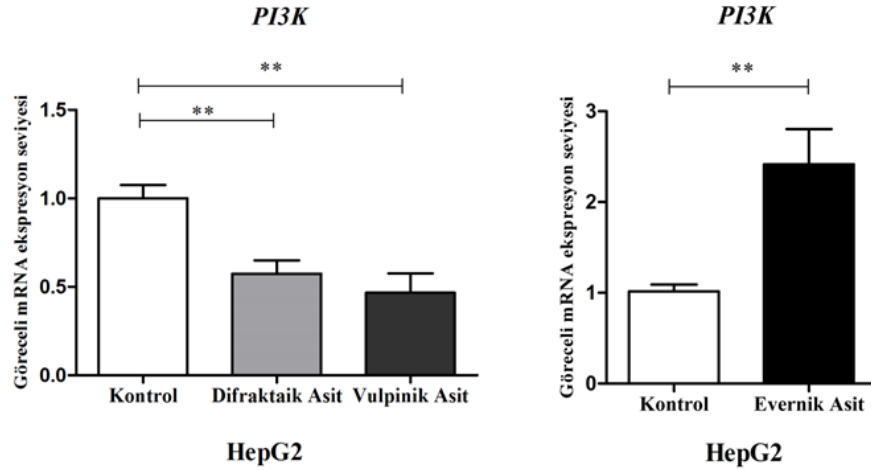
Şekil 48. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *CDK1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ($*p < 0,05$) ve evernik asitle (** $p < 0,001$) muamele edilen HepG2 hücrelerinde *MYC* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü. Vulpinik asitle muamele edilen hücrelerde ise *MYC* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p > 0,05$).



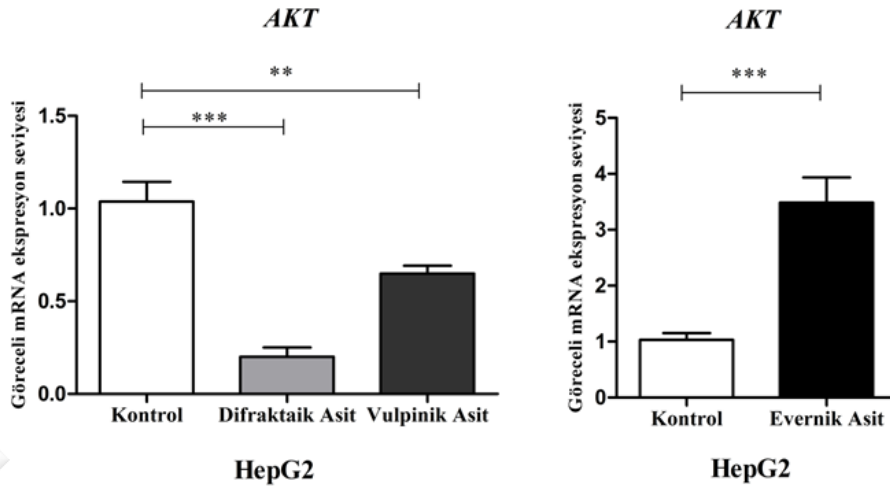
Şekil 49. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *MYC* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit ve vulpinik asitle ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR yolağına ait *PI3K* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görülürken (** $p < 0,01$), evernik asit ile muamele edilen hücrelerde ise kontrole göre artış görüldü (** $p < 0,01$).



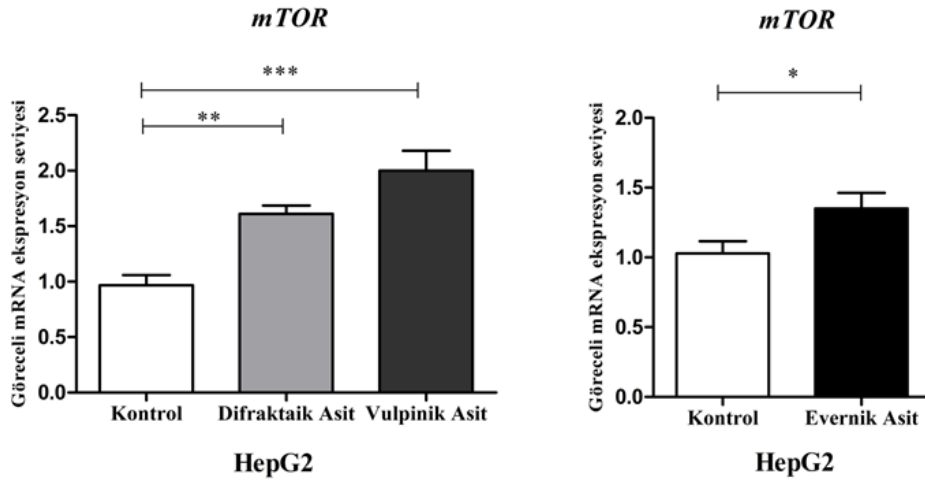
Şekil 50. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *PI3K* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (** $p < 0,001$) ve vulpinik asitle (** $p < 0,01$) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde *AKT* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görülürken, evernik asit ile muamele edilen hücrelerde ise kontrole göre artış görüldü (** $p < 0,001$).



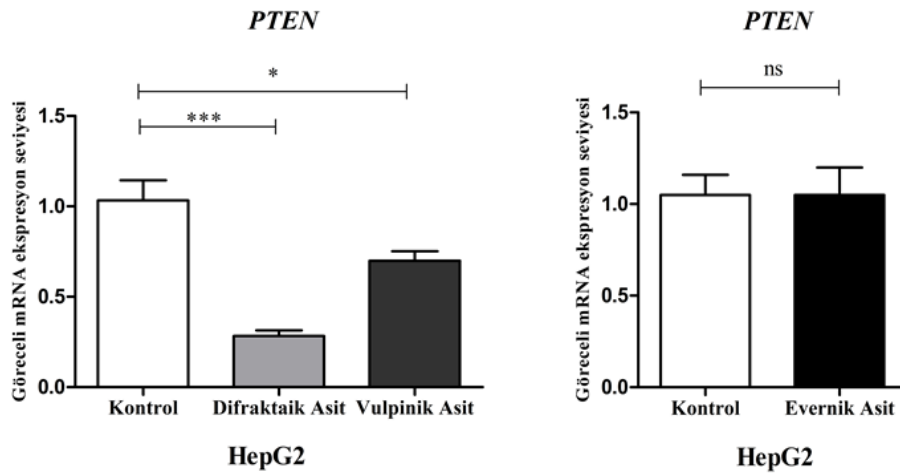
Şekil 51. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *AKT* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (** $p < 0,01$), vulpinik asit (** $p < 0,001$) ve evernik asitle ($p < 0,05$) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde *mTOR* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış görüldü.



Şekil 52. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *mTOR* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Difraktaik asit (** $p < 0,001$) ve vulpinik asit ($p < 0,05$) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR yolağının negatif regülatörü olan *PTEN* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış gözlemlendi. Evernik asit ile muamele hücrelerinde ise *PTEN* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde ($p > 0,05$) ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.

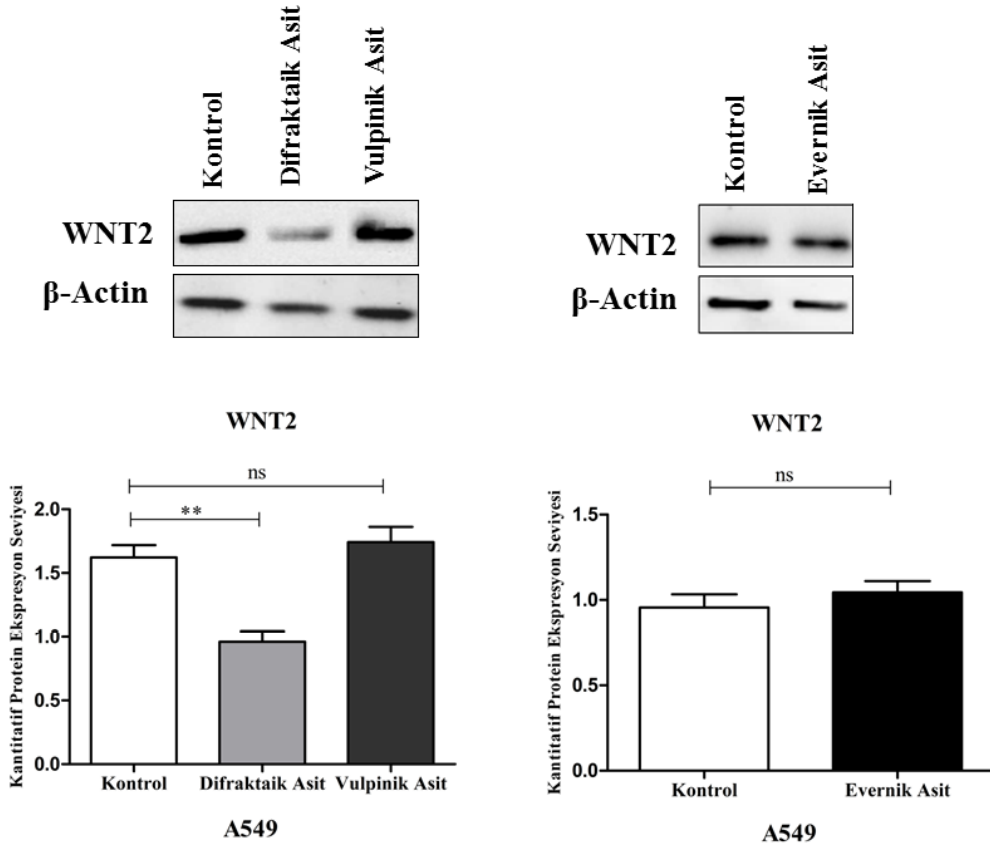


Şekil 53. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik, vulpinik ve evernik asitle zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen HepG2 hücre hattında *PTEN* geninin mRNA ekspresyon seviyesi

Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi (Western Blot) Sonuçları

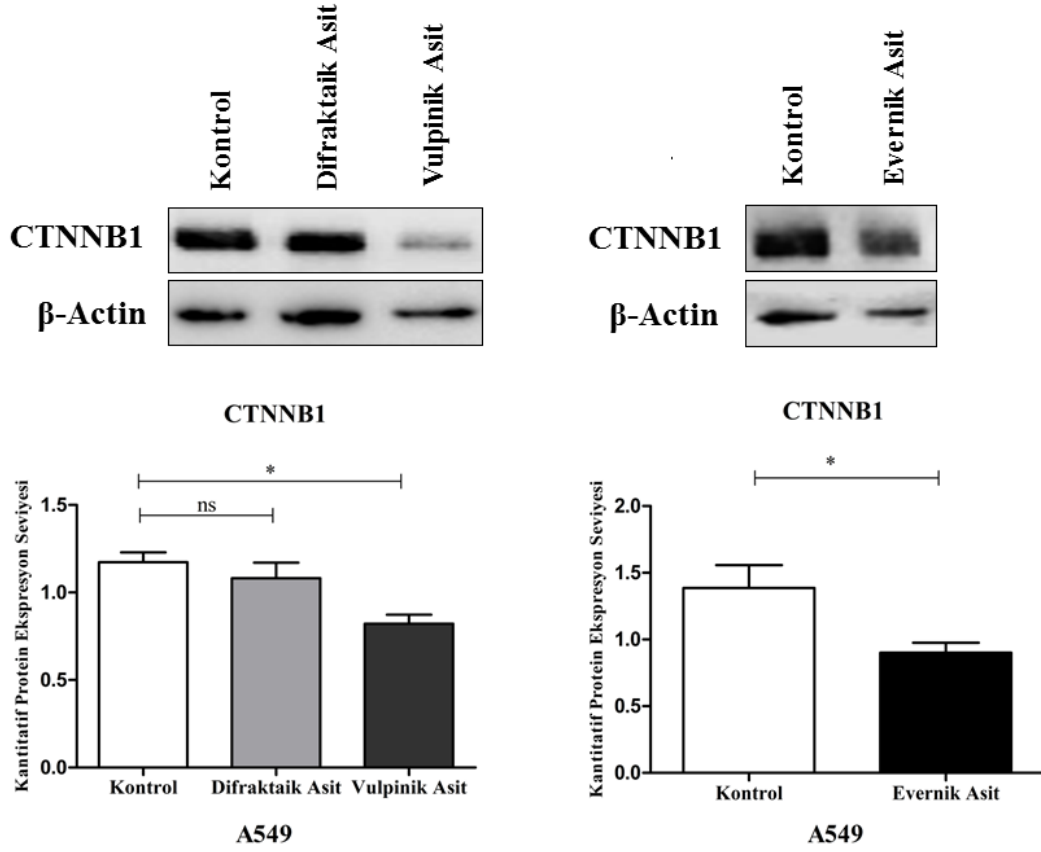
İnsan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında difraktaik, vulpinik ve evernik asit için daha önce belirlenen etkin IC₅₀ dozlarında (Tablo 24) uygulanması sonrasında hazırlanan homojenatlar kullanılarak, WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR yollarının kritik proteinlerinin ekspresyon değişimi western blot analizi incelendi.

Difraktaik asit (**p<0,01) ile muamele edilen A549 hücrelerinde WNT2'nin protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü. Vulpinik asit (p>0,05) ve evernik asit (p>0,05) ile muamele edilen hücrelerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.



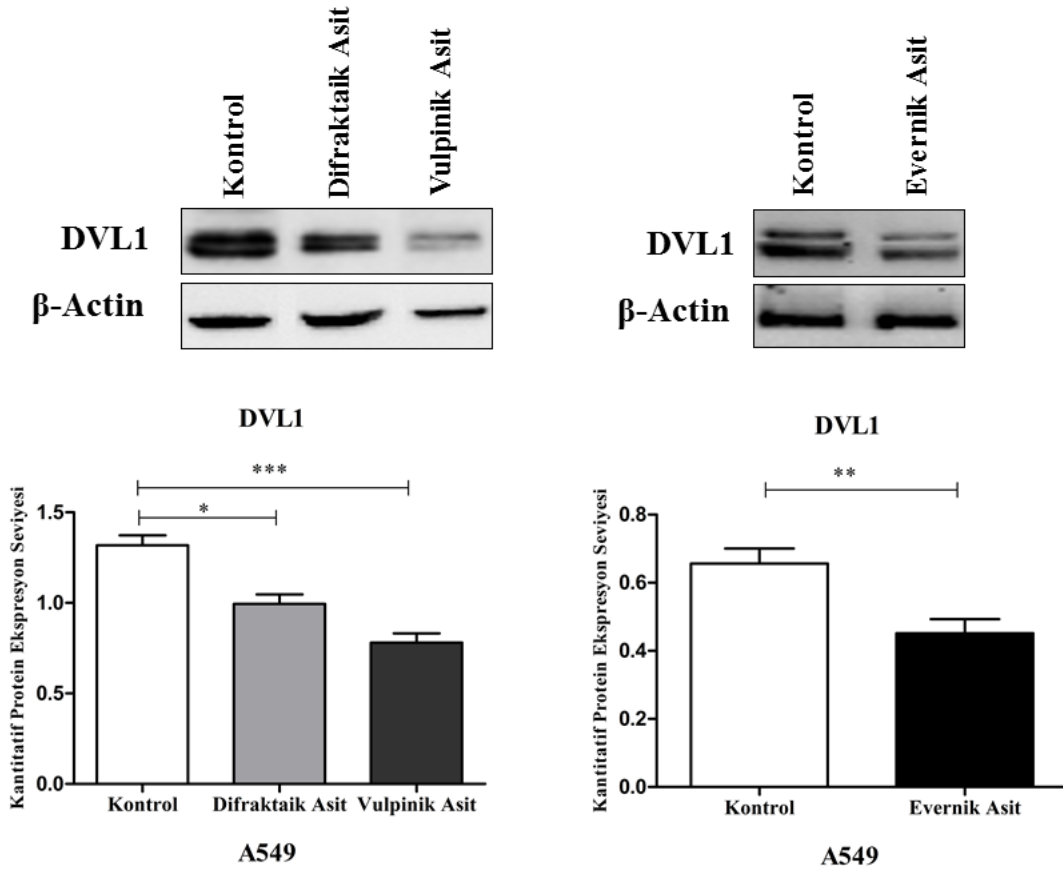
Şekil 54. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde WNT2 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit ile muamele edilen hücrelerde CTNNB1 protein ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$). Vulpinik asit ve evernik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde ise CTNNB1 protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü ($*p<0,05$).



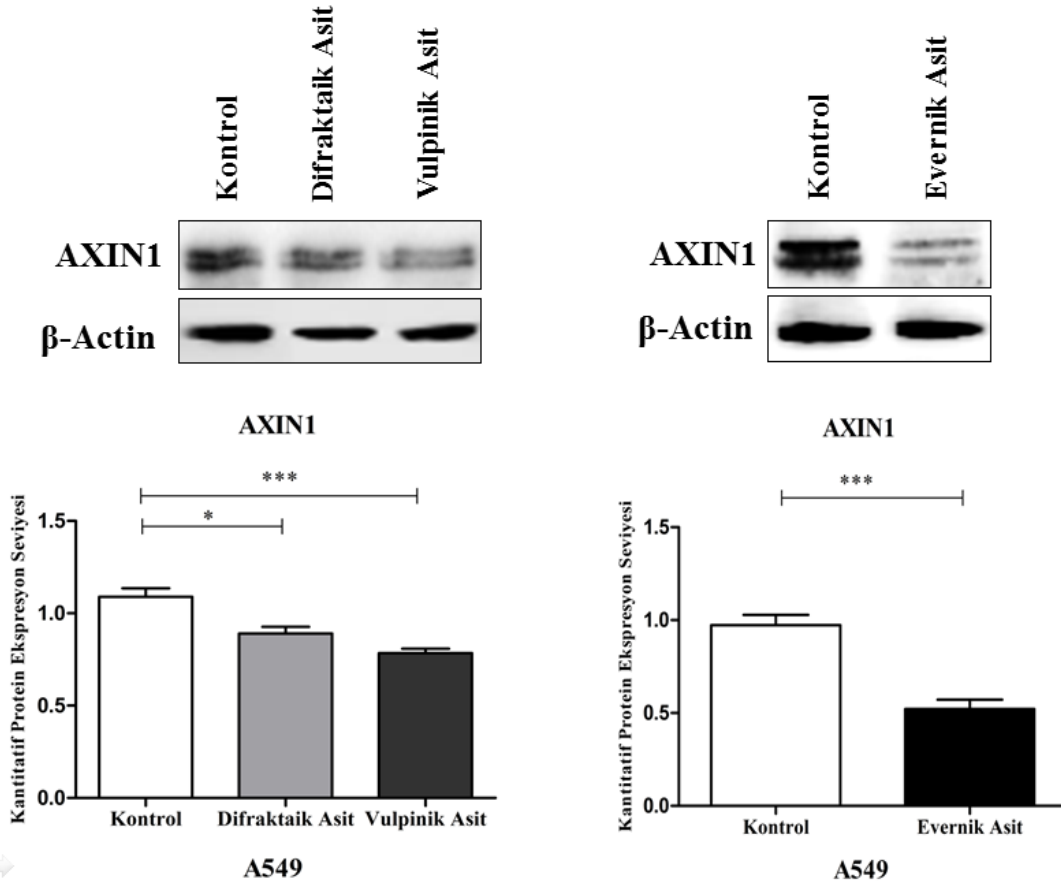
Şekil 55. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde CTNNB1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit (* $p < 0,05$), vulpinik asit (** $p < 0,001$) ve evernik asitle (** $p < 0,01$) ile muamele edilen A549 hücrelerinde DVL1 protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü.



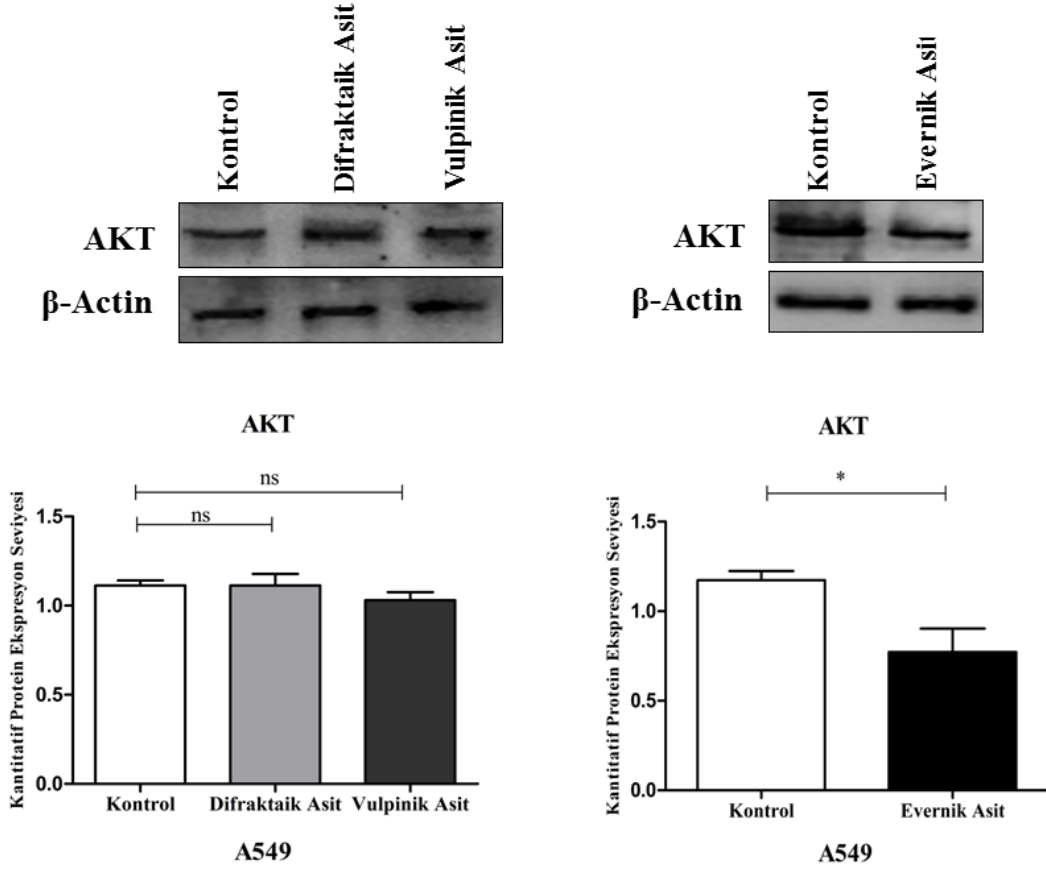
Şekil 56. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde DVL1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit (* $p<0,05$), vulpinik asit (*** $p<0,001$) ve evernik asitle (*** $p<0,001$) ile muamele edilen A549 hücrelerinde AXIN1 protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü.



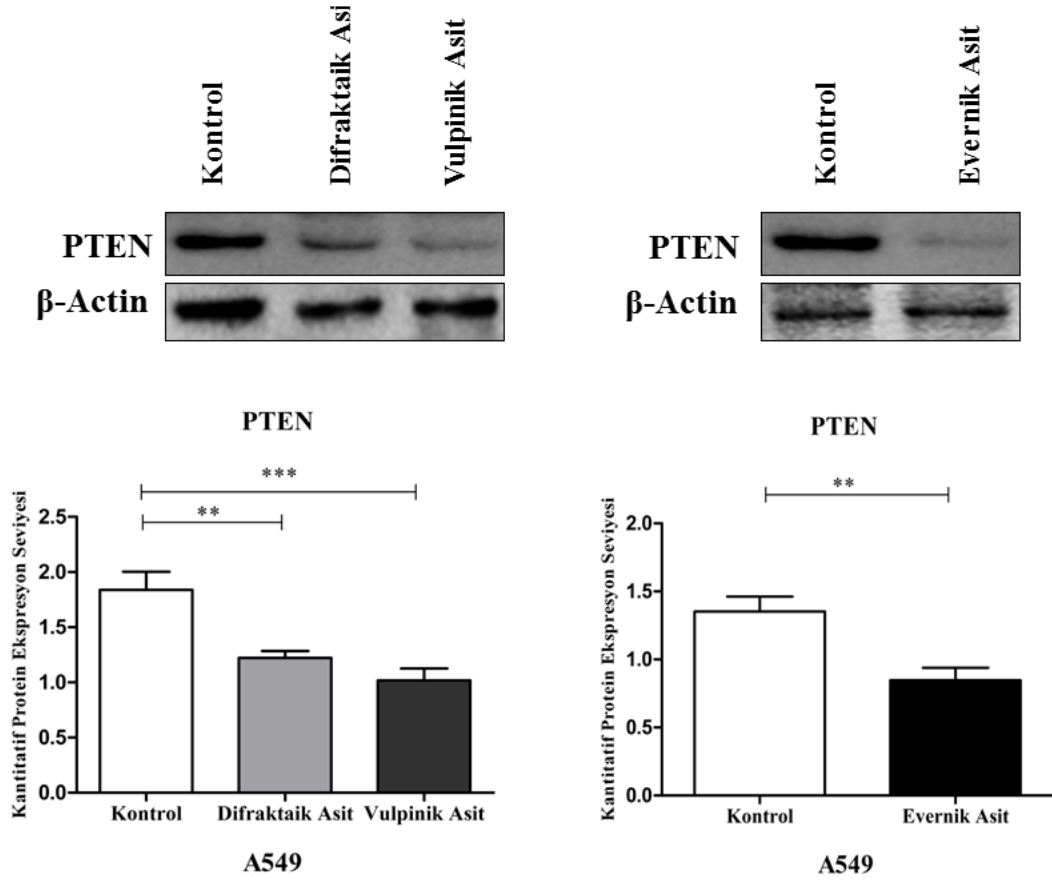
Şekil 57. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde AXIN1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit ve vulpinik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde AKT protein ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$). Evernik asitle ile muamele edilen hücrelerde ise AKT protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü ($*p<0,05$).



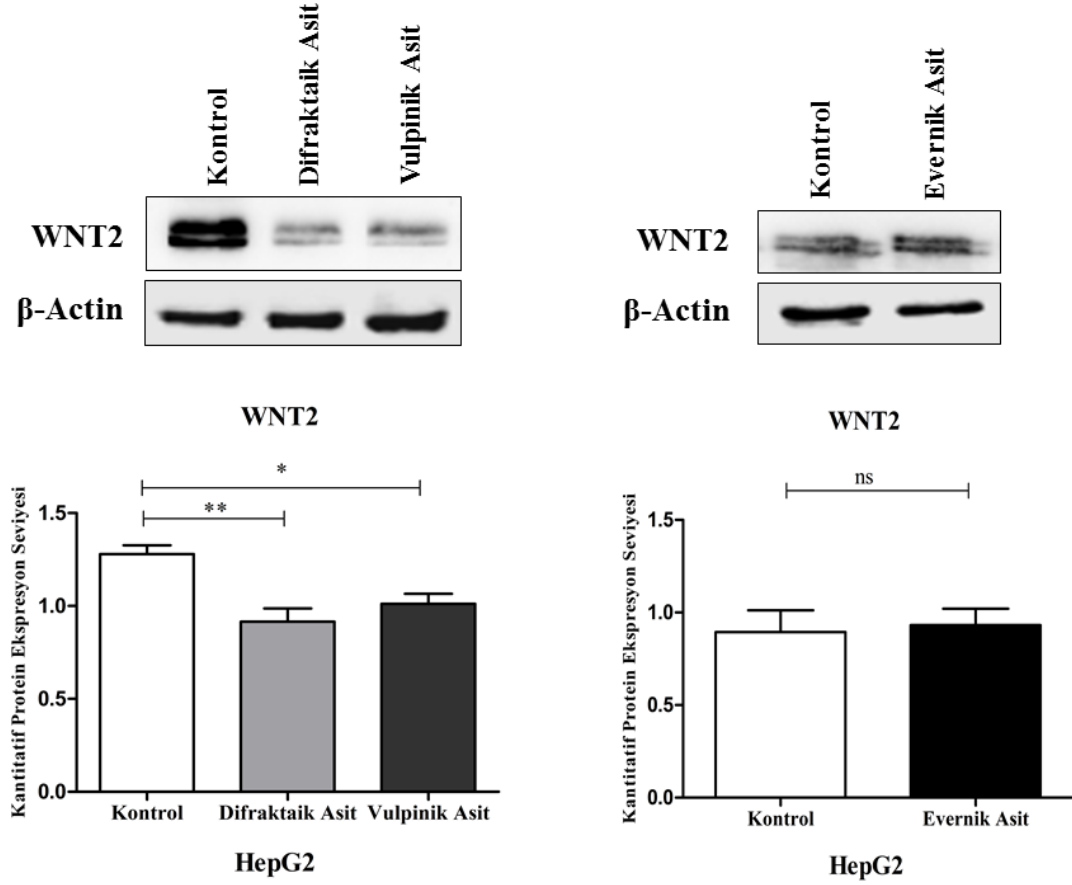
Şekil 58. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde AKT kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit (**p<0,01), vulpinik asit (**p<0,001) ve evernik asitle (**p<0,01) ile muamele edilen A549 hücrelerinde PTEN protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görüldü.



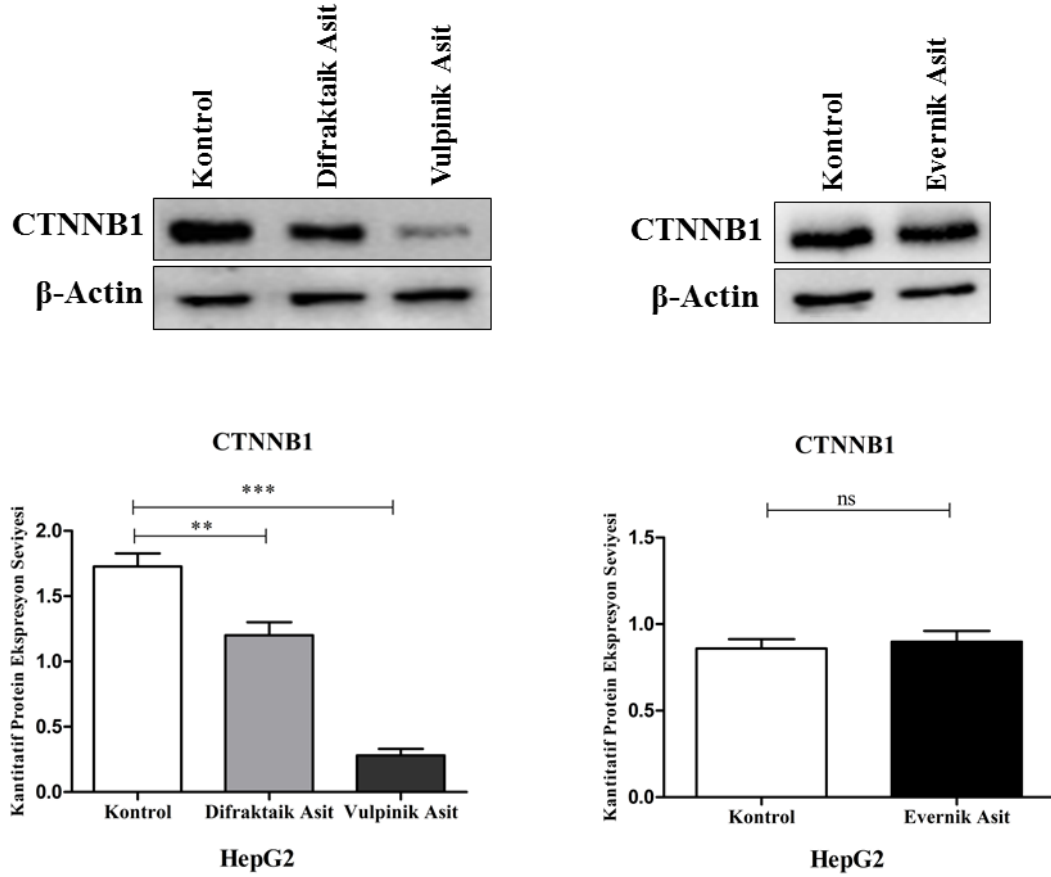
Şekil 59. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde PTEN kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit (**p<0,01) ve vulpinik asit (*p<0,05) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde WNT2 protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görülürken, evernik asitle (p>0,05) ile muamele edilen hücrelerde ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görülmedi.



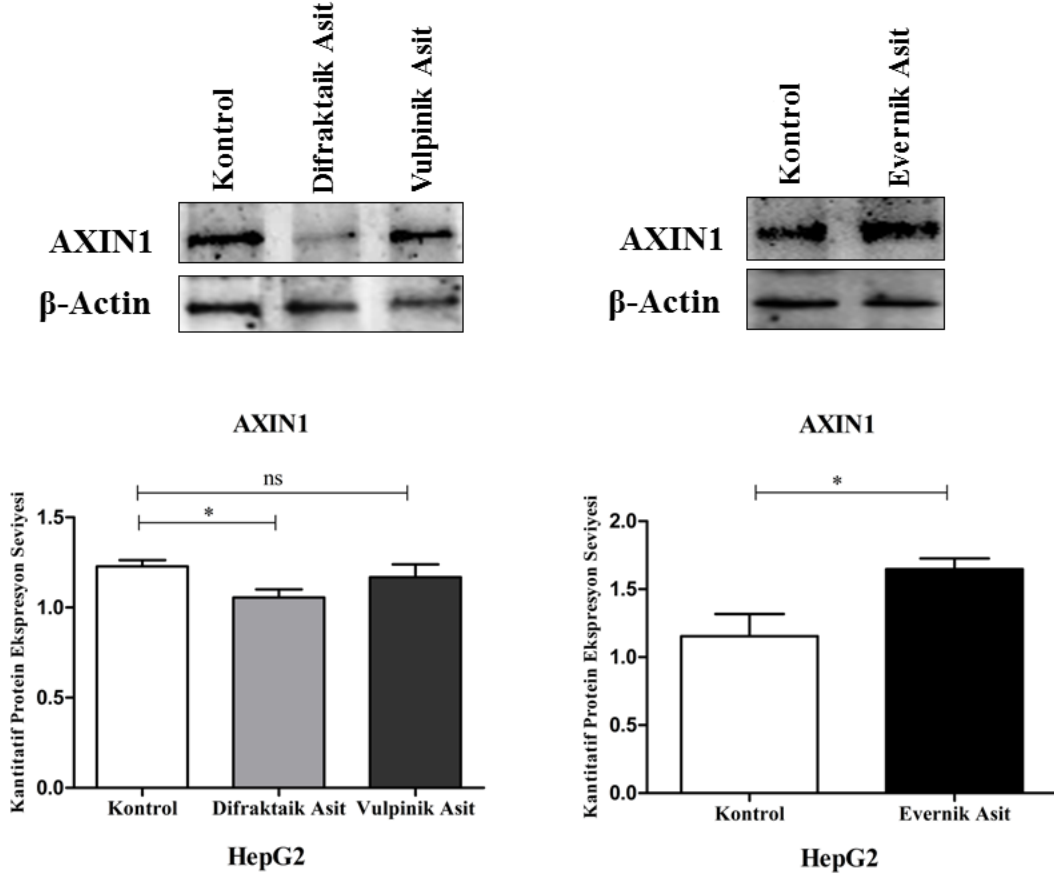
Şekil 60. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde WNT2 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit (** $p < 0,01$) ve vulpinik asit (***) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde CTNNB1 protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görülürken, evernik asitle ($p > 0,05$) ile muamele edilen hücrelerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.



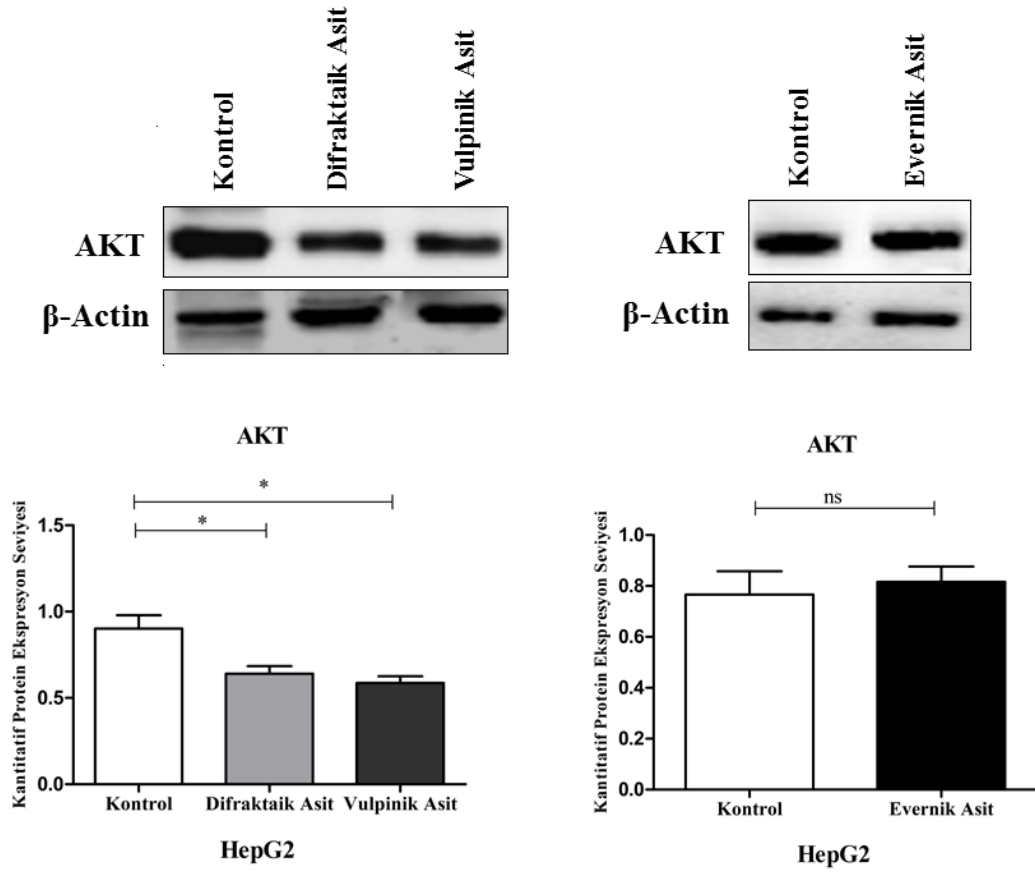
Şekil 61. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde CTNNB1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit (*p<0,05) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde AXIN1 protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görülürken, vulpinik asitle (p>0,05) muamele edilen hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi. Evernik asitle ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde ise kontrole göre artış görüldü (*p<0,05).



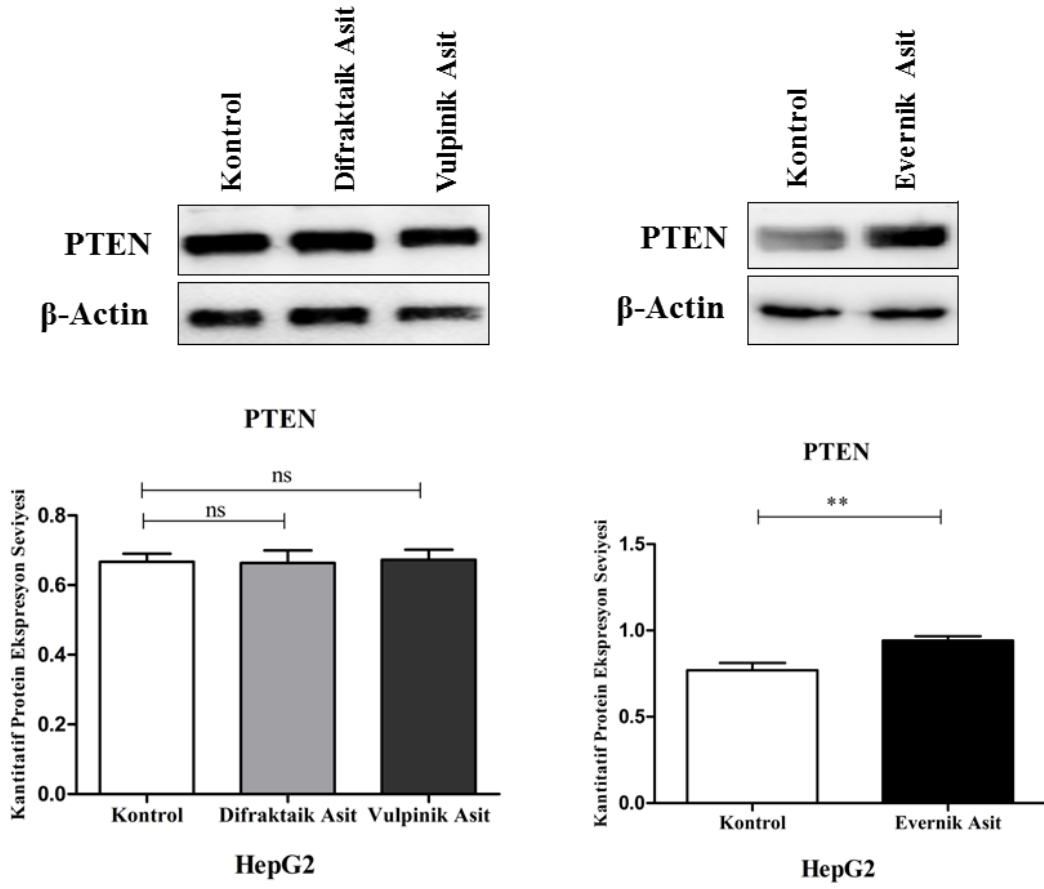
Şekil 62. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde AXIN1 kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

Difraktaik asit ve vulpinik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde AKT protein ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalış görülürken (* $p < 0,05$), evernik asitle ($p > 0,05$) ile muamele edilen hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.



Şekil 63. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde AKT kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

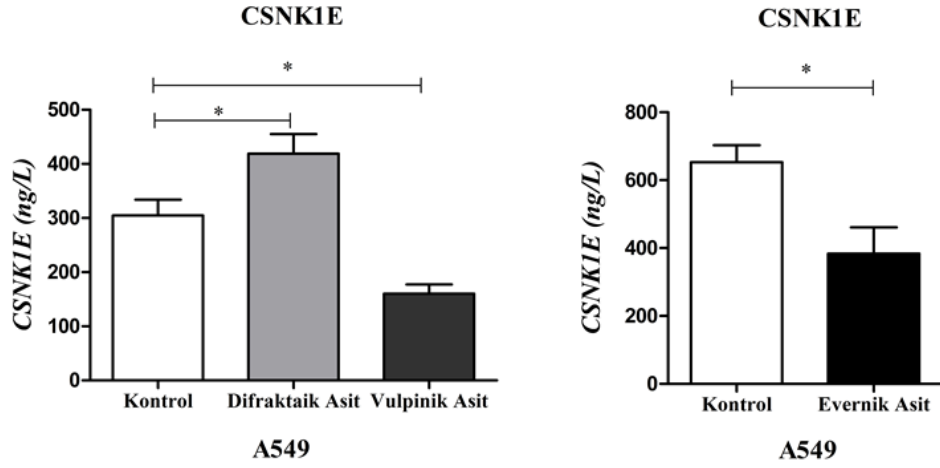
Difraktaik asit ve vulpinik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde PTEN protein ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmezken ($p>0,05$), evernik asitle (** $p<0,01$) ile muamele edilen hücrelerde ise kontrole göre artış görüldü.



Şekil 64. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde PTEN kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi

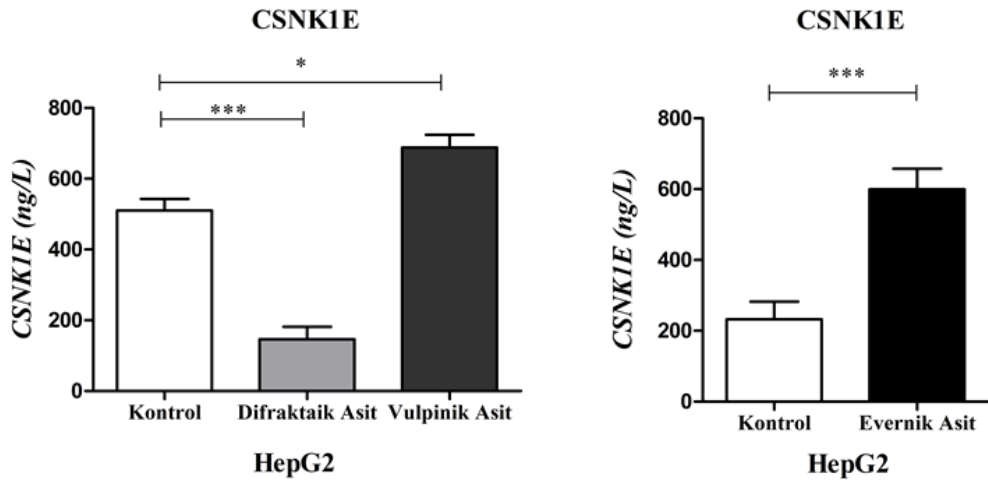
CSNK1E Enzim Miktarının ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Difraktaik asit ile muamele edilen A549 hücre hattında CSNK1E enzim miktarında kontrole göre artış görüldü (* $p < 0,05$). Vulpinik asit ve evernik asitle muamele edilen hücrelerde ise CSNK1E enzim miktarında kontrole göre azalış görüldü (* $p < 0,05$).



Şekil 65. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 hücrelerinde CSNK1E miktarı üzerine etkisi

Difraktaik asit ile muamele edilen HepG2 hücre hattında CSNK1E (** $p < 0,001$) enzim miktarında kontrole göre azalış görüldü. Vulpinik asit (* $p < 0,05$) ve evernik asitle (** $p < 0,001$) muamele edilen hücrelerde ise CSNK1E enzim miktarında kontrole göre azalış görüldü.



Şekil 66. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda zaman ve doza bağlı olarak muamele edilen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin HepG2 hücrelerinde CSNK1E miktarı üzerine etkisi

TARTIŞMA

Kanser insidansı ve mortalitesi dünya çapında hızla artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından küresel olarak kanser hastalarının sayısının 2032'de 22 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (Wang vd 2020). Hâlihazırda dünya çapındaki tüm ölümlerin 1/6'sından kanserin sorumlu olduğu bildirilmektedir. Dünya çapında en ölümcül kanser türü tez kapsamında da çalışılan olan akciğer kanseri olup ülkemizde özellikle erkeklerde akciğer kanseri vakalarında artış görülmüştür (Ergin 2021). Yine tez kapsamında çalışılan karaciğer kanseri, dünyada 1 milyondan fazla insanı etkileyen ve 2016 yılında 800.000 ölümle sonuçlanan bir kanser türüdür (Liu vd 2019). Kanser dramatik mortalite oranının dışında sık görülmesi, tedavi maliyetinin yüksek olması ve yan etkileri nedeniyle de üzerinde en sık araştırma yapılan hastalıklardandır. Kanser tedavisinde kullanılan konvensiyonel yöntemlerin yol açtığı yan etkiler ve kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle likenlerin de dâhil olduğu sekonder metabolitler içeren doğal ürünler, antikanser ilaçların geliştirilmesi için umut verici ajanlar olarak ortaya çıkmıştır. Likenler tarafından üretilen, antibakteriyel, antiviral, anti-inflamatuvar ve antikanser gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olan sekonder metabolitler uzun zamandır çalışılmış olup, olumlu etkileri birçok araştırma sonucuna yansımıştır.

Yapılan araştırmalar kapsamında elde edilen bulgularda difraktaik, evernik ve vulpinik asidin insan meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerinde doz ve zamana bağlı, TRXR1 hedefli olarak antikanser etki gösterdiği görülmüştür. Bu etkiyi apoptozdan ziyade çoğunlukla migrasyonu engelleyerek gösterdikleri belirlenmiştir (Kalın vd 2022). Yine yapılan diğer çalışmalarda akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında difraktaik, evernik ve vulpinik asidin doz ve zamana bağlı olarak antikanser etkisi kanıtlanmış olup, başta evernik asit olmak üzere bu etkiyi apoptozu desteklemekle birlikte migrasyonu önemli derecede engelleyerek gösterdikleri belirlenmiştir (Günaydın vd 2023; Sulukoğlu vd 2024). Ancak literatürde bu liken asitlerinin kanser hücreleri üzerindeki antimigrasyon etkisini hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiği hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında moleküler mekanizmayı aydınlatmak amacıyla anormal düzenlenmeleri sonucunda migrasyon, invazyon ve metastaz başta olmak üzere kanserin birçok karakteristik özelliğinin ortaya çıkmasına neden olan iki kritik yolak WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR yolları aday olarak seçilmiştir.

Bu yollardan ilki olan WNT/ β -KATENİN sinyal yolu organizmalarda başta embriyonik gelişimde olmak üzere hücrelerin dokular arası hareketlerinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Fang vd 2016). Hücrelerin bu migrasyon (göç) süreci doğru hedeflere ulaşarak doku oluşumunu destekler. Ancak yolağın anormal aktivasyonu tümörlerin temel adaptif değişimi olan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve metastatik özellikler kazanmasına neden olur (Schmalhofer vd 2009). EMT, hücrelerin polaritelerini ve hücre-hücre bağlantılarını kaybederek daha invaziv hale gelmelerini teşvik eder (Nguyen vd 2009). Ayrıca bu anormal düzenlenme çeşitli kanser türlerinde kemoterapi ve radyoterapiye karşı koruyucu etki göstererek terapötik dirençte katkıda bulunmaktadır (Clevers 2006; Luo vd 2007; Zhong vd 2020).

Diğer bir yolak olan PI3K/AKT/mTOR yolu aktin filamentlerini düzenleyerek hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini ve hücre hareketliliğinin artmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca hücrelerin birbirine ve ekstraselüler matrikse (ECM) bağlanmasında önemli rol oynayan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu ve aktivitesini düzenler. Bu yolağın aşırı aktivitesi, migrasyon üzerindeki dikkate değer etkisiyle epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) ve metastazı destekler (Glaviano vd 2023).

A549 hücre hattında difraktaik, vulpinik, evernik asidin antimigrasyon potansiyelinin altında yatan mekanizmanın aydınlatılması için ilk olarak WNT/ β -KATENİN yolunun hedef molekülleri gen ve protein seviyesinde incelendi. WNT2, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak sinyal yolunu aktif eder. CTNNB1 yolağın merkez bileşenidir ve sinyalin çekirdeğe kadar ulaşım hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar. DVL1 bu yolağın pozitif düzenleyicisi olup reseptörler ile etkileşime girerek sinyalin hücre içindeki diğer bileşenlere aktarılmasını sağlar. Ayrıca yıkım (destrüksiyon) kompleksinin dağılmasını destekleyerek CTNNB1'in stabilizasyonunu ve çekirdeğe translokasyonunu sağlar (Huang vd 2019). Bu tez çalışmasında, difraktaik asit ve vulpinik asit ile daha önce belirlenen etkin IC₅₀ dozlarında 48 saat muamele edilen A549 hücrelerinde WNT2, CTNNB1 ve DVL1'nin gen seviyesinde arttığı, protein seviyesinde ise azaldığı görüldü. Gen ve protein seviyesindeki değişikliklerde korelasyon olmaması difraktaik ve vulpinik asidin yolak üzerinde post-transkripsiyonel regülasyona neden olabileceğini düşündürmüştür. Araştırmalar mRNA seviyesi ve karşılık gelen protein konsantrasyonlarının yaklaşık olarak %20-40 'nın bağdaştığı bildirilmiştir (Tian vd 2004, Pascal vd 2008). Bu liken asitleri mRNA translasyonunu baskılayarak veya mRNA'yı yıkıma yönlendirerek protein üretimini engelliyor olabilir. WNT/ β -KATENİN sinyal yolağının aktive olması WNT2 sinyalinin reseptörler tarafından tanınmasına bağlıdır ve bu tanıma CTNNB1 seviyesinin artışı ile sonuçlanır. Bu protein seviyelerindeki değişiklikler

WNT sinyal yolağını doğrudan etkileyebilir ve anormal artış onkogenik aktivasyon ile sonuçlanır (Wang vd 2021). Iwai ve arkadaşları, oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde, sitoplazmada CTNNB1 birikiminin TCF/LEF transkripsiyonel aktivitesini indükleyerek MMP-7 ekspresyonunu arttırdığını, böylece epitelial hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümünü, invazyon ve metastazı arttırdığını göstermişlerdir (Iwai vd 2010). Bulgular sonucunda hem yolağın aktivasyonunu sağlayan sinyal ligandının hem de merkez efektörün protein seviyesinde azalma görülmesi yolağın baskılandığını ve kanser hücrelerinde homeostazinin bozulduğunu düşündürülebilir. Kanser hücrelerinde homeostazinin bozulması büyüme, migrasyon, proliferasyon ve metastaz gibi karakteristik özelliklerin baskılanmasını desteklemektedir (Wittekind ve Neid 2005).

Tez kapsamında çalışılan CSNK1E yolağın pozitif düzenleyicisidir. CSNK1E, DVL1 ile etkileşime girer ve onun fosforilasyonunu sağlar. Bu sayede DVL1 hücre membranına yerleşerek sinyali hücre içine iletir. CSNK1E sinyalin yolağın diğer bileşenlerine daha etkili şekilde yayılmasını ve amplifiye olmasını destekler (Klimowski vd 2006; Bryja vd 2007; Bernatik vd 2011; Cruciat 2014). CSKN1E hedefli tedavilerin geleneksel kemoterapi, radyoterapi, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri veya diğer hedefe yönelik ajanlarla birleştirilmesi WNT/CTNNB1 yolağı dahil birden fazla sinyal yolunu sinerjistik olarak inhibe edebilir ve anti-tümör etkiyi artırabilir (Long vd 2020). Çalışmamızda difraktaik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde CSNK1E miktarının arttığı görüldü. CSNK1E miktarı, WNT ve DVL1'nin gen ekspresyon seviyelerinin artmasına bağlı olarak olası bir sinyal alınımı ve aktarılması ihtimaline karşı hazırlıklı olunması amacıyla artmış olabilir. Vulpinik asitle muamele edilen A549 hücrelerinde ise CSNK1E miktarının azaldığı görüldü. Yapılan birçok çalışma ile CSNK1E'nin farmakolojik inhibisyonu veya shRNA aracılı ablasyonunun, pankreas kanseri, sarkom, meme kanseri, kolorektal kanser, yumurtalık kanseri ve lösemik hücrelerin büyümesini veya hayatta kalmasını engellediği gösterilmiştir (Brockschmidt vd 2008; Yang vd 2008; Kim vd 2010; Ye vd 2015; Rodriguez; Deng vd 2017) AXIN1 ise destruksiyon kompleksinin bir bileşenidir ve CTNNB1 yıkımını indükleyerek sinyal yolağını negatif olarak düzenler. Difraktaik asit ve vulpinik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde AXIN1'in gen seviyesinde arttığı, protein seviyesinde ise azaldığı görüldü. Kanser hücrelerinde liken asitlerinin etkisiyle AXIN1'in gen ekspresyonu indüklenmiş olsa da terapötik ajanlar bazen hücrelerde kompanzasyon mekanizmasını devreye sokabilir. Bu mekanizmalar da proliferasyonu ve migrasyonu düzenleyen sinyal yollarında kompanze edici değişiklikler yaparak farmakolojik ajanların etkisini azaltmak veya tersine çevirmek için çaba gösterebilir (Gee vd 2006; Bergholz vd 2021).

Difraktaik ve vulpinik asidin yolak üzerindeki etkisini daha iyi anlamak amacıyla yolağın son basamağında görev alan ve bir transkripsiyon faktörü olan *TCF-4*'ün gen ekspresyon seviyesi incelendi. *TCF4*, *CTNNB1*'in çekirdeğe lokasyonunun ardından DNA'ya bağlanır ve *MYC*, *CCND1*, *CDK1* gibi çeşitli hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Yan vd 2017). Difraktaik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde *TCF-4*'ün gen ekspresyon seviyesinde değişiklik görülmedi. Bu durum *TCF-4*'ün difraktaik asidin doğrudan hedefi olmadığını düşündürülebilir. Aynı zamanda transkripsiyonları *TCF-4* tarafından düzenlenen *MYC*, *CCND1*, *CDK1*'in da gen ekspresyon değişimleri incelendi. Bu üç genin ortak noktası hücre döngüsü geçiş noktalarında kritik roller oynamaları ve aşırı ekspresyonlarının kanserleşme sürecini desteklemesidir. Difraktaik asit ile muamele sonucunda kanser hücrelerinde *MYC*, *CCND1*, *CDK1*'in gen ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlendi. Bu durum kanser hücrelerinin antikanser ajana karşı direnç geliştirmek veya etkisini dengelemek amacıyla adaptif bir yanıt olarak hücre döngüsü düzenleyicilerinin gen ekspresyonunu arttırmış olabileceğini düşündürmüştür. Vulpinik asitle muamele edilen hücrelerde ise *TCF-4*'ün gen seviyesinde arttığı görüldü. *MYC* ve *CCND1*'in gen ekspresyon seviyesi azalırken *CDK1*'in gen seviyesinin arttığı görüldü. *TCF-4* aynı zamanda hücre farklılaşmasında görev alan önemli bir gen regülatörüdür. Hücre farklılaşmasını indükleyerek belirli hücre tiplerinin oluşumunu sağlar (Forrest vd 2014). Vulpinik asit kanser hücrelerinde *TCF-4*'ün ekspresyonunu arttırarak hücre farklılaşmasını destekleyip daha az agresif bir fenotip kazanmasını teşvik ediyor olabilir. Ayrıca *CCND1* ve *MYC* gibi insan neoplazilerinde aşırı ekspresyona olduğu bilinen proto-onkogenlerin ekspresyonunun azalması vulpinik asidin antiproliferatif etkisini hücre döngüsü düzenleyicilerini üzerinden gösterdiğini net bir şekilde ortaya koymaktadır.

Evernik asitle daha önce belirlenen etkin IC_{50} dozları ile 24 saat muamele edilen A549 hücrelerinde *WNT2*, *CTNNB1* ve *DVLI*'nin gen seviyesi değişmezken protein seviyeleri azaldı. Bu durum evernik asidin translasyon sonrası düzenlemelerle veya protein stabilitesini etkileyerek aktivite gösterdiğini düşündürülebilir. Translasyon verimliliği azalacağından gen seviyesi sabit kalırken proteinler daha hızlı bir şekilde parçalanarak hücredeki seviyeleri azalabilir. *WNT2* ligandının reseptöre bağlanmaması durumunda sinyal yolağı inaktif olarak kalır, *CTNNB1* yıkım kompleksi tarafından etiketlenerek proteozomda parçalanır. Evernik asit *WNT2* sinyalini inhibe ederek dolaylı yoldan ubikuitin-proteozom sistemini aktif hale getirmiş ve *CTNNB1*'in yıkımını desteklemiş olabilir. Ji ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada benzer şekilde doğal bir polifenolik fitokimyasal olan resveratrolün *CTNNB1*'in nükleer lokalizasyonunu azaltarak kolorektal kanser hücrelerinin istilasını ve metastazını engellediği görülmüştür (Ji vd 2013). *WNT/β-KATENİN* yolağının pozitif düzenleyicileri

olan DVL1'in protein seviyesinin ve CSNK1E enzim miktarının azaldığı görüldü. DVL1, WNT/ β -KATENİN yolağında yıkım kompleksini baskılayarak CTNNB1'in etiketlenmesini önler ve çekirdeğe transloke olmasını teşvik eder (Wild vd 2020). CSNK1E ise DVL1 ile birlikte WNT sinyalinin amplifiye olmasını sağlayarak yolak aktivasyonunun sürdürülmesini sağlar (Bernatik vd 2011). Bütün bulgular birlikte düşünüldüğünde WNT2 sinyalinin olmaması ve yıkım kompleksinin baskılanmaması yolağın evernik asit tarafından inhibe edildiğini açıkça ortaya koymaktadır.

TCF-4 bir transkripsiyon faktörü olmasının yanısıra kanser hücrelerinde WNT sinyalinden bağımsız bir mekanizmayla kemorezistanstı kritik seviyede artırmaktadır (Kendziorra vd 2011). Yapılan bir çalışmada enzalutamid direncinde rol oynayan kritik yolları belirlemek amacıyla birden fazla enzalutamide dirençli insan CaP hücre dizisi geliştirilmiş ve *TCF-4* aşırı ekspresyonunun enzalutamid direnciyle sonuçlandığını görülmüştür (Lee vd 2019). Çalışmamızda evernik asit uygulaması sonrası A549 hücrelerinde *TCF-4*'ün gen ekspresyonunda azalış görüldü. Bu azalış kanser hücrelerinde ilaç tedavilerine karşı olan direncin azalması anlamına gelebilir. Ayrıca *TCF-4*'ün hem yolağın bir parçası hem de yolaktan bağımsız bir proto-onkogen olduğu düşünüldüğünde evernik asit için terapötik hedef olabilir. Evernik asitle 24 saat muamele edilen A549 hücrelerinde *CCND1*, *CDK1* ve *MYC*'nin mRNA ekspresyon seviyelerinin de önemli ölçüde azaldığı görüldü. Bu durum CTNNB1 ve *TCF-4*'ün ekspresyon seviyelerindeki azalış ile korelasyon göstermektedir. CTNNB1'in azalması *TCF-4* ile birleşmesini engelleyerek genlerin ifadesini önlemiş olabilir. Ayrıca genlerin transkripsiyonunun doğrudan veya dolaylı olarak baskılanarak mRNA seviyelerinin azaltılması evernik asidin promotör bölgelerine veya transkripsiyon faktörlerine etki ettiğini de düşündürmüştür. Sonuç olarak evernik asit WNT/ β -KATENİN yolunu inhibe ederek ve hücre döngüsünün ilerlemesini durdurmaya çalışarak antikanser etkisini göstermektedir.

A549 hücre hattında difraktaik, vulpinik, evernik asidin antimigrasyon etkisinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacıyla tez kapsamında diğer bir aday yolak olan PI3K/mTOR/AKT yolunun hedef molekülleri gen ve protein seviyesinde incelendi. Difraktaik asit ile daha önce belirlenen etkin IC₅₀ dozları ile 48 saat muamele edilen A549 hücrelerinde *PI3K* ve *mTOR* genlerinin ekspresyon seviyesinin değişmediği görüldü. Vulpinik asit ile muamele edilen hücrelerde ise *PI3K* ve *mTOR* genlerinin ekspresyon seviyesinin arttığı görüldü. Difraktaik asit ve vulpinik asit ile muamele edilen kanser hücrelerinde AKT gen seviyesinde azalış görülürken, protein seviyesinde yine her iki asit için değişiklik görülmedi. AKT'nin aşırı aktivasyonu insan malignitelerinin ortak bir moleküler özelliğidir

(Song vd 2019). Gen ekspresyon seviyesinin azalmasına rağmen protein ekspresyon seviyesinin değişmemesi AKT proteinin hücredeki kararlılığı ile ilişkili olabilir. mRNA seviyesi azalsa da mevcut AKT proteinleri uzun bir yarı ömre sahip olabilir veya post-translasyonel modifikasyonlar yardımıyla stabilitesinin artması söz konusu olabilir. Bu durum yeni protein sentezinin azalması halinde bile yıkım yeterince hızlı olmadığından protein seviyesinin sabit kalmasına neden olabilir. *AKT1*, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun bir üyesi olmasının yanısıra mutasyonu ve aşırı aktivasyonu birçok kanser türünde tümör oluşumu ve ilerlemesine neden olan bir onkogendir. Bu nedenle protein seviyesinde değişiklik görülmesi bile difraktaik asit ve vulpinik asitle muamele edilmesinin ardından gen seviyesinde azalma görülmesi oldukça önemlidir. PI3K/AKT/mTOR sinyalleme bileşenlerinin gen ekspresyon kontrolünde, promotor metilasyonu, miRNA'lar ve transkripsiyon faktörleriyle yapılan düzenlemeler de dâhil olmak üzere birçok faktör rol oynar (Yu vd 2022). Bu asitler transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini azaltarak veya baskılayıcı transkripsiyon faktörlerini artırarak *AKT1* geninin transkripsiyonunu engelliyor olabilir. Bunların dışında *AKT1* geninin baskılanmasında promotor bölgesinde meydana gelen epigenetik değişiklikler de söz konusu olabilir. Hollander ve arkadaşları mutant KRAS'ın indüklediği LA2 farelerinde *AKT1* ablasyonunun, akciğer tümör oluşumunu önlediğini göstermiştir (Hollander vd 2011). Bu çalışmamız sonucunda, PI3K/AKT/mTOR yolağının negatif regülatörü olan PTEN'in difraktaik asit ile muamele edilen A549 hücrelerinde gen ekspresyon seviyesinde artış görülürken, vulpinik asitle muamele edilen hücrelerde ise değişiklik görülmedi. Protein seviyesi ise hem difraktaik asit ile muamele edilen hücrelerde hem de vulpinik asit ile muamele edilen hücrelerde azaldığı görüldü. Difraktaik asit ile muamele edildikten sonra kanser hücrelerinde *PTEN*'in mRNA ekspresyonunun artması protein üretimini artırma potansiyeline sahip olduğunu gösterir ve hücrel sinyal yollarını düzenlemeye yönelik bir yanıt olabilir. Ancak *PTEN*'in protein seviyesinde azalmanın görülmesi ise çelişkilidir. Bir onkogen olan *AKT*'nin de gen ekspresyon seviyesinin azalması, karsinogenezde anormal seviyede arttığı bilinen protein sentezinin değişmemesi ve bu sonuçlara ek olarak tümör baskılayıcı bir gen olan *PTEN*'nin gen seviyesinde artması, difraktaik asidin kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve metastaz yapma gibi karakteristik özelliklerini baskılamaya çalıştığını gösterir. Kanser hücreleri *PTEN* gen ekspresyonuna karşı proteinin yıkımını artırarak veya translasyonunu engelleyerek bu baskılama girişimine karşı bir adaptif yanıt geliştirebilir.

HepG2 hücre hattında difraktaik, vulpinik, evernik asidin antimigrasyon potansiyelinin altında yatan mekanizmanın açığa çıkarılması amacıyla ilk olarak WNT/ β -KATENİN yolunun hedef molekülleri gen ve protein seviyesinde incelendi. Difraktaik asit ile 48 saat

muamele edilen HepG2 hücrelerinde WNT/ β -KATENİN yolağına ait WNT2 geninin mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmezken protein seviyesinde azalış görüldü. Vulpinik asit ile muamele edilen hücrelerde ise WNT2'nin hem gen hem de protein seviyesinde azalış görüldü. Yapılan bir çalışmada benzer şekilde hücre proliferasyonunu önlediği bilinen bir bioflavonid olan resveratolün kolon kanseri hücre hatlarında WNT sinyalini önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür (Hope vd 2008). Ayrıca WNT sinyal yolunun birçok hücrenel mekanizma ile hücre hareketliliğini artırdığı, dolayısıyla kanser hücrelerinin migrasyonunun bu yolun aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir (Li vd 2011; Schambony ve Wedlich 2013). Bu nedenle, bu liken asitlerinin WNT sinyal moleküllerinin üretimini azaltarak WNT/ β -KATENİN yolunun ilk basamaktan itibaren etkilediği görülmektedir. Ayrıca WNT sinyalinin azalması ile birlikte CTNNB1'in stabilizasyonu ve çekirdek içine taşınması engellenir ve yolağın genel aktivitesi baskılanır. Bu baskılanma sayesinde hücre migrasyonu ve proliferasyonu gibi WNT sinyali ile düzenlenen süreçler baskılanmaktadır. Difraktaik ve vulpinik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde CTNNB1'in gen ve protein ekspresyon seviyelerinin önemli oranda azalması bu durumu desteklemektedir. Wan ve ark. β -KATENİN sinyal yolu aktivasyonunun MCF7, HCT116 ve A549 hücre hatlarında MT1-MMP ekspresyonunu arttırarak migrasyon ve invazyonu indüklediğini belirlemişlerdir (Wan vd 2019).

Difraktaik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde *DVLI* geninin mRNA seviyelerinde artış görülürken vulpinik asit ile muamele edilen hücrelerde değişiklik görülmedi. Kanser hücreleri WNT sinyalinin ve yolak aktivitesininin azalmasına karşı bir kompensatör yanıt olarak *DVLI* gen ekspresyon seviyesini artırabilir veya mevcut ekspresyon seviyesini korumaya çalışabilir. Difraktaik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde *AXIN1* geninin mRNA seviyelerinde artış görülürken protein seviyesinde azalış görüldü. Tümör baskılayıcı bir protein olan *AXIN1* WNT sinyal yolunun güçlü bir inhibitörüdür. *AXIN1*'in WNT yolundaki birincil işlevi, *CTNNB1* yıkım kompleksinin bir araya getirmektir. (Salahshor ve Woodgett, 2005; Mazzoni vd 2014). 2017 yılında yapılan bir çalışmada bir *CTNNB1* inhibitörü olan PKF118-310 ve bir sekonder metaboliti olan fizodik asidin kolon kanseri hücre hatlarında (HCT116 ve DLD-1) WNT sinyalinin azalmasının *AXIN* protein miktarının azalmasına neden olabileceği gösterilmiştir (Paluszczak vd 2018). Vulpinik asitle muamele edilen hücrelerde ise *AXIN1* gen ekspresyon seviyesinde artış görülürken protein seviyesi değişmedi. *AXIN1*'in gen seviyesinde artması WNT yolunun baskılanmasını desteklerken, protein seviyesinin korunması stabilitesini ve işlevini sürdürerek hücrede dengenin sağlandığını göstermektedir.

Difraktaik asit ve vulpinik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde transkripsiyon faktörü olan *TCF-4*'ün ekspresyon seviyesinde azalış gözlemlendi. Bu azalma, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu teşvik eden WNT sinyal yolu hedef genlerinin ekspresyonunun azalması anlamına gelmektedir. Difraktaik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde *CCND1*, *CDK1* ve *MYC* mRNA ekspresyon seviyesinin azalması, bu durumu desteklemektedir. Bu bulgular difraktaik asidin kanser hücrelerinde WNT sinyal yolu ve hücre döngüsü regülasyonunu etkilemekle birlikte migrasyon kapasitelerini sınırlayarak invazyon ve metastaz yeteneklerini baskılayabileceğini göstermektedir. Vulpinik asit ile muamele edilen hücrelerde ise *CCND1* gen ekspresyon seviyesi azalırken, *CDK1* ve *MYC* ekspresyon seviyeleri değişmedi. *CCND1*'in aşırı ekspresyonunun hücre göçü ve istilasını arttırdığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada let-7i-3p'nin *CCND1* gen ekspresyonunu doğrudan azaltarak HCT116 kolon kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü, çoğalmasını, göçünü ve istilasını inhibe ettiğini gösterilmiştir (Tu vd 2022). Başka bir çalışma ise HOXD-AS1'in kolon kanserinde çoğalma, göç ve istilasını teşvik etmek için *CCND1* ekspresyon seviyesini arttırdığını göstermiştir (Yan vd 2020). Çalışmamızdan elde edilen bulgular ve önceki çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde vulpinik asidin de WNT sinyal yolunu baskılayarak hücre proliferasyonu ve migrasyonunu baskıladığı özellikle hücre döngüsü düzenleyicilerinden *CCND1* üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür.

Araştırmamız kapsamında evernik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde WNT2 gen seviyesinde azalırken protein seviyesinde değişmediği görüldü. Gen ekspresyon seviyesinin azalması sinyalin azalmasına katkıda bulunabilir. Ancak bu ekspresyon azalışı hâlihazırda protein seviyesine yansımamış olabilir. Ayrıca CTNNB1'in gen ve protein seviyesinin değişmediği görülmüştür. Bu durum kaskada gelen sinyalin hala sürdüğünü düşündürmüştür. Ancak dikkat çekici bir şekilde hücre içerisine sinyal iletiminin temel aracısı olan DVL1 gen seviyesinde azalırken, WNT sinyal yolunu baskılayan AXIN1 gen ve protein seviyesinde artmıştır. Bu artış sonucunda CTNNB1'in proteozom aracılığıyla yıkımının indüklenmesi beklenmektedir. AXIN1'in gen ve protein seviyesinde artması evernik asidin HepG2 hücrelerinde, hücre göçü ve metastazın azalmasını teşvik ettiğini düşündürse de CTNNB1 seviyelerinin değişmemesi bu etkinin bazı sınırlamaları olabileceğini göstermektedir. HepG2 hücrelerinde evernik asitle muamele sonrasında CSNK1E miktarında artış görüldü. Hem WNT yolağının pozitif bir regülatörü hem de G1/S faz geçişinde ve M fazında rol alan kritik bir hücre döngüsü düzenleyicisi olan CSNK1E'in artışı evernik asidin antimigrasyon etkisini farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. HepG2 hücrelerinde *TCF4* ve *CCND1*'in gen ekspresyon seviyesinin arttığı, *CDK1*'in gen seviyesinin değişmediği görüldü. *TCF-4*, WNT sinyal yolunun nükleer hedeflerinden biridir

ve hücre proliferasyonu için kritik genlerin ekspresyonunu sağlar. *CCND1* ve *CDK1* ise hücre döngüsü kontrol noktalarında görev almaları nedeniyle kanser tedavisi için potansiyel birer hedefdir. Bu karsinogenezde görev alan üç kritik genin ekspresyon seviyelerinin azalması veya değişmemesi sinyal yolağının hala aktif olduğunu ve hedef genlerin ekspresyonunu sürdürdüğünü göstermektedir. Dikkat çekici bir şekilde evernik asit ile muamele sonrası HepG2 hücrelerinde *MYC*'nin ekspresyon seviyesinin azaldığı görüldü. *MYC*, kanser hücrelerinin istilası ve göçü üzerindeki spesifik etkileri aracılığıyla tümör metastazını düzenleyen bir onkogendir. Bu durum evernik asidin WNT/ β -KATENİN yolağından bağımsız şekilde *MYC*'yi spesifik olarak hedef alıp antimigrasyon aktivite gösterdiğini düşündürmüştür.

Yapılan bu tez çalışmasında HepG2 hücre hattında difraktaik, vulpinik, evernik asidin antimigrasyon etkisinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacıyla diğer bir aday yolak olan PI3K/mTOR/AKT yolunun hedef molekülleri gen ve protein seviyesinde incelendi. Difraktaik asit ve vulpinik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR yolağına ait PI3K gen ekspresyon seviyesinin azaldığı görüldü. Bu durum liken asitlerinin sinyal yolağını ilk basamağından itibaren etkilediğini göstermektedir. Bu azalış önemlidir çünkü kaskadın diğer bir üyesi olan AKT'yi etkileyebilir. Nitekim bulgularımız bu durumu destekler niteliktedir. Difraktaik asit ve vulpinik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde AKT'nin hem gen hem de protein seviyesinde azaldığı görülmüştür. AKT, sinyal yolunun birincil aracısıdır ve ekspresyonun azalması hücrelerin hareket kabiliyetini kısıtlayabilir. Sonuç olarak kanser hücrelerinde migrasyon ve metastatik potansiyelin baskılanmasına neden olur. (Vandermoere vd 2007; Ju vd 2007; Cao vd 2017). Ayrıca mTOR'un gen ekspresyonunun arttığı görüldü. Bunun yanısıra yolağın negatif regülatörü olan PTEN, hem gen hem de protein seviyesinde azaldı. Bu azalış, proliferasyonun ve hücre büyümesinin artmasına neden olabilir. Ancak PTEN'in ekspresyonu, AKT'nin anormal ekspresyonu sonucunda indüklendiği düşünüldüğünde AKT'nin gen ve protein seviyesindeki azalmaya bağlı olarak azalış göstermiş olabilir (Simpson ve Parsons 2001).

Evernik asitle muamele edilen HepG2 hücre hattında *PI3K*, *AKT* ve *mTOR* genlerinin arttığı ve AKT protein seviyesinin değişmediği görülmüştür. Ayrıca yolağın negatif regülatörü PTEN gen seviyesinde değişmezken protein seviyesinde artmıştır. Yolak elemanlarının gen seviyesindeki artış yolun aktivasyonuna yönelik bir eğilim olduğunu gösterse de sinyal yolunun temel aracısı olan AKT'nin protein seviyesinin değişmemesi ve PTEN'nin protein seviyesinin artması bu aktivasyon eğilimini dengeleyen hatta baskılayan bir faktördür. Wu ve ark. kolon kanserinde miR-21'in PTEN'i baskılayarak hücre büyümesini ve

istilasını artırdığını ortaya çıkarmıştır (Cheng vd 2022). Hepatoselüler karsinom hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada ise miR-19a-3p'nin PTEN/AKT yolu yoluyla tümör metastazını ve kemorezistansı desteklediğini bulmuşlardır (Jiang vd 2018). Bu çalışmalar özellikle AKT ve PTEN'nin migrasyondaki kritik rolünü göstermektedir. Bulgularımız literatürdeki çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde evernik asidin spesifik olarak AKT ve PTEN'i hedef alarak antiproliferatif ve antimigrasyon etki gösterdiği belirlenmiştir.


Sonuç ve Öneriler

- 1- Difraktaik asit A549 hücre hattında, WNT2, CTNNB1 ve DVL1 protein seviyelerini kritik derecede azalttığı ve *AXIN1*'i gen seviyesinde artırdığı görüldü. Böylece difraktaik asidin kanser hücrelerinin invazyon yeteneğini baskıladığı ve WNT/ β -KATENİN yolağı üzerinde oluşturduğu gen ve protein seviyesindeki düzensizliklerle antimigrasyon etki gösterdiği görülmüştür.
- 2- Difraktaik asit, A549 hücre hattında, *AKT* gen ekspresyon seviyesini azaltarak ve PTEN ekspresyon seviyesini gen düzeyinde artırıp, protein seviyesinde koruyarak PI3K/AKT/mTOR yolağı üzerinden migrasyonun baskılanmasını desteklemiştir.
- 3- Vulpinik asit A549 hücre hattında, WNT2 gen seviyesini azaltarak, *AXIN1*'i gen seviyesinde artırarak, CTNNB1'in protein ekspresyonunu baskılayarak ve DVL1'in protein ekspresyonunu azaltarak antimigrasyon potansiyelini güçlendirmiştir. Dahası *CCND1* ve *MYC* gibi iki kritik onkogeni baskılayarak antiproliferatif etki göstermiştir.
- 4- Evernik asit A549 hücre hattında, CTNNB1 ve DVL1'nin protein ekspresyonunu baskılayarak, *AXIN1* gen seviyesini artırarak, *TCF-4*, *CCND1*, *CDK1* ve *MYC*'nin gen seviyelerini ve CSNK1E enzim miktarını azaltarak antimigrasyon etki göstermiştir.
- 5- Difraktaik asit HepG2 hücre hattında, WNT2 ve CTNNB1'i baskılayarak, *AXIN1*'i gen seviyesinde artırarak, *TCF-4*, *CCND1*, *CDK1* ve *MYC*'yi gen seviyelerini ve CSNK1E enzim miktarını azaltarak WNT/ β -KATENİN yolağı üzerinden antimigrasyon etki göstermiştir.
- 6- Difraktaik asit ve vulpinik asit HepG2 hücre hattında, *PI3K* gen seviyesini azaltarak, *AKT1*'i gen ve protein seviyesinde baskılayarak antimigrasyon etkisini güçlendirmiştir.
- 7- Vulpinik asidin HepG2 hücre hattında, WNT2 ve CTNNB1'i gen ve protein seviyesinde baskılaması, *AXIN1*'in gen ekspresyon seviyesini arttırması ve *TCF-*

4'ün gen ekspresyonunu azaltması, bu asidin antimigrasyon aktivitesini bu bileşenler üzerinden gerçekleştirdiğini göstermiştir.

- 8- Evernik asidin HepG2 hücre hattında, *WNT2*, *DVL1* ve *MYC*'yi gen seviyesinde baskılaması, *AXIN1*'i gen seviyesinde artırması, *PTEN*'i protein seviyesinde artırması antimigrasyon aktivitesi ile ilişkilendirilebilir. Ancak diğer asitlerle karşılaştırıldığında hücre hareketliliğini engellemek amacıyla WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR yolları dışında farklı bir mekanizma kullanıldığı düşünülebilir. Bu asidin antimigrasyon mekanizmasının aydınlatılması için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.
- 9- WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları birçok geni, proteini ve karmaşık protein-protein etkileşimlerini içeren karmaşık sinyal iletim sistemleridir. Tez kapsamında antimigrasyon aktivite gösterdiği bilinen difraktaik, vulpinik ve evernik asidin A549 ve HepG2 hücre hatlarında her iki sistemin farklı aşamalarındaki farklı bileşenlerini spesifik olarak etkileyerek bu etkiyi gösterdiği görülmüştür.

Şekil 67-71'de difraktaik, vulpinik ve evernik asit ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında WNT/ β -KATENİN ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları bileşenlerinin kantitatif gen ve protein ekspresyon seviyesindeki değişim ile ELISA testi sonuçları toplu bir şekilde verilmiştir. Şekillerde bulunan, (\uparrow) sembolü artış, (\downarrow) sembolü azalış, (\leftrightarrow) sembolü ise değişimin olmadığını göstermektedir. Sembollerin yanında istatistiksel olarak hesaplanan p değerleri (*) sembolü ile gösterilmiştir.



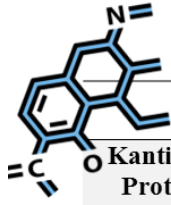
Kantitatif Gen Ekspresyonu	A549			HepG2		
	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit
<i>WNT2</i>	\uparrow ***	\downarrow *	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\downarrow *	\downarrow *
<i>CTNNB1</i>	\uparrow **	\uparrow *	\leftrightarrow	\downarrow ***	\downarrow **	\leftrightarrow
<i>DVL1</i>	\uparrow *	\uparrow ***	\leftrightarrow	\uparrow **	\leftrightarrow	\downarrow ***
<i>AXIN1</i>	\uparrow **	\uparrow ***	\uparrow *	\uparrow *	\uparrow **	\uparrow ***
<i>TCF4</i>	\leftrightarrow	\uparrow ***	\downarrow **	\downarrow **	\downarrow *	\uparrow ***
<i>CCND1</i>	\uparrow *	\downarrow *	\downarrow **	\downarrow ***	\downarrow **	\uparrow *
<i>CDK1</i>	\uparrow *	\uparrow ***	\downarrow ***	\downarrow ***	\leftrightarrow	\leftrightarrow
<i>MYC</i>	\uparrow **	\downarrow ***	\downarrow *	\downarrow *	\leftrightarrow	\downarrow ***

Şekil 67. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında WNT/ β -KATENİN sinyal yolağı bileşenlerinin gen ekspresyon seviyesi üzerine etkisi



Kantitatif Gen Ekspresyonu	A549			HepG2		
	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit
<i>PI3K</i>	↔	↑*	↔	↓**	↓**	↑**
<i>AKT</i>	↓*	↓***	↔	↓***	↓**	↑***
<i>mTOR</i>	↔	↑**	↓**	↑**	↑***	↑*
<i>PTEN</i>	↑**	↔	↑*	↓***	↓*	↔

Şekil 68. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı bileşenlerinin gen ekspresyon seviyesi üzerine etkisi



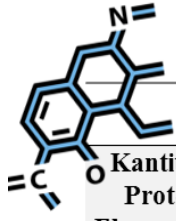
Kantitatif Protein Ekspresyonu	A549			HepG2		
	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit
<i>WNT2</i>	↓**	↔	↔	↓**	↓*	↔
<i>CTNNB1</i>	↔	↓*	↓*	↓**	↓***	↔
<i>DVL1</i>	↓*	↓***	↓**	-	-	-
<i>AXIN1</i>	↓*	↓***	↓***	↓*	↔	↑*

Şekil 69. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında WNT/β-KATENİN sinyal yolağı bileşenlerinin protein ekspresyon seviyesi üzerine etkisi



ELISA	A549			HepG2		
	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit
<i>CSNK1E</i>	↑*	↓*	↓*	↓***	↑*	↑***

Şekil 70. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında WNT/β-KATENİN sinyal yolağı elemanı CSNK1E ELISA analizi sonuçları



Kantitatif Protein Ekspresyonu	A549			HepG2		
	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit	Difraktaik Asit	Vulpinik Asit	Evernik Asit
AKT	↔	↔	↓*	↓*	↓*	↔
PTEN	↓**	↓***	↓**	↔	↔	↑**

Şekil 71. Liken asitleri ile muamele edilen insan akciğer (A549) ve karaciğer (HepG2) kanseri hücre hatlarında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı kritik bileşenlerinin protein ekspresyon seviyesi üzerine etkisi

KAYNAKLAR

- Abbott, M., and Ustoyev, Y., 2019. Cancer and the immune system: the history and background of immunotherapy. In *Seminars in oncology nursing* (Vol. 35, No. 5, p. 150923). WB Saunders.
- Abe, M., 2011. Targeting the interplay between myeloma cells and the bone marrow microenvironment in myeloma. *International journal of hematology*, 94, 334-343.
- Alexander, T. B., Gu, Z., Iacobucci, I., Dickerson, K., Choi, J. K., Xu, B., Payne-Turner, D., Yoshihara, H., Loh M. L., Horan, J., Buldini, B., Basso, G., Elitzur, S., de Haas, V., Zwaan, C. M., Yeoh, A., Reinhardt, D., Tomizawa, D., Kiyokawa, N., Lammens, T., De Moerloose, B., Catchpoole, D., Hori, H., Moorman, A., Moore, A. S., Hrusak, O., Meshinchi, S., Orgel, E., Devidas, M., Borowitz, M., Wood, B., Heerema, N. A., Carrol, A., Yang, Y. L., Smith, M. A., Davidsen, T. M., Hermida, L. C., Gesuwan, P., Marra, M. A., Ma, Y., Mungall, A. J., Moore, R. A., Jones, S. J. M., Valentine, M., Janke, L. J., Rubnitz, J. E., Pui, C. H., Ding, L., Liu, Y., Zhang, J., Nichols, K. E., Downing, J. R., Cao, X., Shi, L., Pounds, S., Newman, S., Pei, D., Guidry Auvil J. M., Gerhard, D. S., Hunger, S. P., Inaba, H., Mullighan, C. G., 2018. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature*, 562(7727), 373-379.
- Akoumianakis, I., Polkinghorne, M., Antoniadis, C., 2022. Non-canonical WNT signalling in cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews Cardiology*, 19(12), 783-797.
- Allen, C., Her, S., Jaffray, D. A., 2017. Radiotherapy for cancer: present and future. *Advanced drug delivery reviews*, 109, 1-2.
- Asplund, J. and Wardle, D. A., 2017. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological reviews*, 92(3), 1720-1738.
- Astudillo, P., 2021. A non-canonical Wnt signature correlates with lower survival in gastric cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 633675.
- Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J., 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.
- Bergholz, J. S., and Zhao, J. J., 2021. How compensatory mechanisms and adaptive rewiring have shaped our understanding of therapeutic resistance in cancer. *Cancer research*, 81(24), 6074-6077.
- Bernatik, O., Ganji, R. S., Dijksterhuis, J. P., Konik, P., Cervenka, I., Polonio, T., Igor, C., Polonio, T., Krejci, P., Schulte, G., Bryja, V., 2011. Sequential activation and inactivation of dishevelled in the Wnt/ β -catenin pathway by casein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10396-10410.
- Bernhardt, E. B. and Jalal, S. I., 2016. Small cell lung cancer. *Lung cancer: Treatment and research*, 301-322.
- Bessadóttir, M., Eiríksson, F. F., Becker, S., Ögmundsdóttir, M. H., Ómarsdóttir, S., Thorsteinsdóttir, M., Ögmundsdóttir, H. M., 2015. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of lichen-derived compound protolichesterinic acid are not mediated by its

- lipoxygenase-inhibitory activity. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 98, 39-47.
- Bhatt, A. P. and Damania, B., 2013. AKTivation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by KSHV. *Frontiers in immunology*, 3, 401.
- Bozkurt, H., 2022. [Sol akciğer kanserlerinin radyoterapisinde üç boyutlu konformal radyoterapi ile statik ve dinamik yoğunluk ayarlı radyoterapi planlama tekniklerinin dozimetrik olarak karşılaştırılması.] Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Aydın Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.
- Brisdelli, F., Perilli, M., Sellitri, D., Piovano, M., Garbarino, J. A., Nicoletti, M., Bozzi, A., Amicosante, G., Celenza, G., 2013. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytotherapy research*, 27(3), 431-437.
- Brockschmidt, C., Hirner, H., Huber, N., Eismann, T., Hillenbrand, A., Giamas, G., Radunsky B, Ammerpohl, O., Bohm, B., Henne-Bruns, D., Kalthoff, H., Leithäuser, F., Trauzold, A., Knippschild, U., 2008. Anti-apoptotic and growth-stimulatory functions of CK1 delta and epsilon in ductal adenocarcinoma of the pancreas are inhibited by IC261 in vitro and in vivo. *Gut*, 57(6), 799-806.
- Brown, Z. J., Tsilimigras, D. I., Ruff, S. M., Mohseni, A., Kamel, I. R., Cloyd, J. M., Pawlik, T. M., 2023. Management of hepatocellular carcinoma: a review. *JAMA surgery*, 158(4), 410-420.
- Bryja, V., Schulte, G., Rawal, N., Grahn, A., Arenas, E., 2007. Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. *Journal of cell science*, 120(4), 586-595.
- Burkholder, P. R., Evans, A. W., McVeigh, I., Thornton, H. K., 1944. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 30(9), 250-255.
- Cairrão, F. and Domingos, P. M., 2010. Apoptosis: molecular mechanisms. *eLS*.
- Cansaran-Duman, D., Guney Eskiler, G., Colak, B., Sozen Kucukkara, E., 2021. Vulpinic acid as a natural compound inhibits the proliferation of metastatic prostate cancer cells by inducing apoptosis. *Molecular Biology Reports*, 48, 6025-6034.
- Cao, W., Yu, P., Yang, K., & Cao, D., 2022. Aflatoxin B1: Metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 32(6), 395-419.
- Cao, Z., Liao, Q., Su, M., Huang, K., Jin, J., Cao, D., 2019. AKT and ERK dual inhibitors: the way forward?. *Cancer letters*, 459, 30-40.
- Cardile, V., Graziano, A. C. E., Avola, R., Piovano, M., Russo, A., 2017. Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. *Chemico-biological interactions*, 263, 36-45.
- Carneiro, B. A. and El-Deiry, W. S., 2020. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.
- Catalano, T., Selvaggi, F., Esposito, D. L., Cotellese, R., & Aceto, G. M., 2023. Infectious Agents Induce Wnt/ β -Catenin Pathway Dereglulation in Primary Liver Cancers. *Microorganisms*, 11(7), 1632.
- Cesur-Ergün, B. and Demir-Dora, D., 2023. Gene therapy in cancer. *The Journal of Gene Medicine*, 25(11), e3550.
- Chae, W. J. and Bothwell, A. L., 2018. Canonical and non-canonical Wnt signaling in immune cells. *Trends in immunology*, 39(10), 830-847.

- Chen, M. S., Woodward, W. A., Behbod, F., Peddibhotla, S., Alfaro, M. P., Buchholz, T. A., Rosen, J. M., 2007. Wnt/ β -catenin mediates radiation resistance of Sca1+ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *Journal of cell science*, 120(3), 468-477.
- Chen, Q., Kang, J., Fu, C., 2018. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal transduction and targeted therapy*, 3(1), 18.
- Cheng, Y., Yu, C., Li, W., He, Y., Bao, Y., 2022. Matrine inhibits proliferation, invasion, and migration and induces apoptosis of colorectal cancer cells via miR-10b/PTEN pathway. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 37(10), 871-881.
- Cicenas, J. and Valius, M., 2011. The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 137, 1409-1418.
- Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B., Sarkar, D., 2021. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Advances in cancer research*, 149, 1-61.
- Choe, J. H., Mazambani, S., Kim, T. H. Kim, J. W., 2021. Oxidative stress and the intersection of oncogenic signaling and metabolism in squamous cell carcinomas. *Cells*, 10(3), 606.
- Chowdhury, T., A., 2010. Diabetes and Cancer. *QJM: An International Journal of Medicine*. 103(12), 905-915.
- Clevers, H., 2006. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480.
- Combalia, A. and Carrera, C., 2020. Squamous cell carcinoma: an update on diagnosis and treatment. *Dermatology Practical & Conceptual*, 10(3).
- Cruciat, C. M., 2014. Casein kinase 1 and Wnt/ β -catenin signaling. *Current opinion in cell biology*, 31, 46-55.
- D'arcy, M. S., 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.
- de Castro Fonseca, J., de Oliveira, Y. S., Bezerra, B. P., Ellena, J., Honda, N. K., Silva, C. V. N. S., da Silva Santos, N. P., Santos-Magalhães, N. S., Ayala, A. P., 2016. Diffractaic acid: Crystalline structure and physicochemical characterization. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 165, 26-32.
- de Sousa, V. M. L. and Carvalho, L., 2018. Heterogeneity in lung cancer. *Pathobiology*, 85(1-2), 96-107.
- Dehghanifard, A., Kaviani, S., Abroun, S., Mehdizadeh, M., Saiedi, S., Maali, A., Ghaffari, S., Azad, M., 2018. Various signaling pathways in multiple myeloma cells and effects of treatment on these pathways. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 18(5), 311-320.
- DelNero, P., Hopkins, B. D., Cantley, L. C., Fischbach, C., 2018. Cancer metabolism gets physical. *Science Translational Medicine*, 10(442):eaaq1011.
- Deng, C., Lipstein, M. R., Scotto, L., Jirau Serrano, X. O., Mangone, M. A., Li, S., Vendome, J., Hao, Y., Xu, X., Deng, S. X., Realubit, R. B., Tatonetti, N. P., Karan, C., Lentzsch, S., Fruman, D. A., Honig, B., Landry, D. W., O'Connor, O. A., 2017. Silencing c-Myc translation as a therapeutic strategy through targeting PI3K δ and CK1 ϵ in hematological malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(1), 88-99.

- Deshpande, A., Sicinski, P., Hinds, P. W., 2005. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909-2915.
- Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T., Brenner, D. A., 2020. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 245(2), 96-108.
- Di Fiore, R., D'Anneo, A., Tesoriere, G., Vento, R., 2013. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, 228(8), 1676-1687.
- Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., Abramson D. H., Shields, C. L., Chantada, G. L., Njuguna, F., Gallie, B. L., 2015. Retinoblastoma. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-23.
- Domingues, B., Lopes, J. M., Soares, P., Pópulo, H., 2018. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy*, 7, 35-49.
- Duffy, M. J., 2013. The war on cancer: are we winning? *Tumor Biology*, 34(3):1275-84.
- Easwaran, V., Lee, S. H., Inge, L., Guo, L., Goldbeck, C., Garrett, E., Wiesmann, M., Garcia, P. D., Fuller, J. H., Chan, V., Randazzo, F., Gundel, R., Warren, R. S., Escobedo, J., Aukerman, S. L., Taylor, R. N., Fantl, W. J., 2003. β -Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer research*, 63(12), 3145-3153.
- Einarsdóttir, E., Groeneweg, J., Björnsdóttir, G. G., Harðardóttir, G., Omarsdóttir, S., Ingólfssdóttir, K., Ögmundsdóttir, 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., Turkez, H., Joughi, A., Kaya, A., 2018b. The anti-cancer efficacies of diffractaic, lobaric, and usnic acid: In vitro inhibition of glioma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(5), 941-951.
- Engelman, J. A., Luo, J., Cantley, L. C., 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7(8), 606-619.
- Ergin, I., 2021. Dünyada ve Türkiye'de Güncel Kanser İstatistikleri. *Turkiye Klinikleri Public Health Nursing-Special Topics*, 7(2), 6-10.
- Ettinger, D. S., Akerley, W., Bepler, G., Blum, M. G., Chang, A., Cheney, R. T., Chirieac, L. R., D'Amico, T. A., Demmy, T. L., Ganti, A. K., Govindan, R., Grannis, F. W. Jr., Jahan, T., Jahanzeb, M., Johnson, D. H., Kessinger, A., Komaki, R., Kong, F. M., Kris, M. G., Krug, L. M., Le, Q. T., Lennes, I. T., Martins, R., O'Malley, J., Osarogiagbon, R. U., Otterson, G. A., Patel, J. D., Pisters, K. M., Reckamp, K., Riely, G. J., Rohren, E., Simon, G. R., Swanson, S. J., Wood, D. E., Yang, S. C., 2010. Non-small cell lung cancer. *Journal of the national comprehensive cancer network*, 8(7), 740-801.
- Fabbri, G. and Dalla-Favera, R., 2016. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 16(3), 145-162.
- Fang, L., Zhu, Q., Neuenschwander, M., Specker, E., Wulf-Goldenberg, A., Weis, W. I., von Kries, J. P., Birchmeier, W., 2016. A small-molecule antagonist of the β -catenin/TCF4 interaction blocks the self-renewal of cancer stem cells and suppresses tumorigenesis. *Cancer research*, 76(4), 891-901.
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., Fares, Y., 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 28.

- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., Donato, F., 2004. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127(5), S35-S50.
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Bilslund, A., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S. S., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S. I., Azmi, A. S., Bhakta, D., Halicka, D., Keith, W. N., Nowsheen, S., 2015. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. In *Seminars in cancer biology*. 35, 25-54.
- Feng, X., Song, Q., Yu, A., Tang, H., Peng, Z., Wang, X., 2015. Receptor-interacting protein kinase 3 is a predictor of survival and plays a tumor suppressive role in colorectal cancer. *Neoplasma*, 62(4), 592-601.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. 149(4), 778-789.
- Fernández-Moriano, C., Gómez-Serranillos, M. P., Crespo, A., 2016. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 1-17.
- Forner, A., Reig, M., Bruix, J., 2018. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 391(10127),1301-1314.
- Forrest, M. P., Hill, M. J., Quantock, A. J., Martin-Rendon, E., Blake, D. J., 2014. The emerging roles of TCF4 in disease and development. *Trends in molecular medicine*, 20(6), 322-331.
- Fouad, Y. A. and Aanei, C., 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016-1036.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., Samali, A., 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International journal of cell biology*, 2010(1), 214074.
- Gee, J. M. W., Shaw, V. E., Hiscox, S. E., McClelland, R. A., Rushmere, N. K., Nicholson, R. I., 2006. Deciphering antihormone-induced compensatory mechanisms in breast cancer and their therapeutic implications. *Endocrine-related cancer*, 13 Suppl 1, 77-88.
- Gerstberger, S., Jiang, Q., Ganesh, K., 2023. Metastasis. *Cell*, 186(8), 1564-1579.
- Giles, F. J., Krawczyk, J., O'Dwyer, M., Swords, R., Freeman, C., 2014. The role of inflammation in leukaemia. *Advances in experimental medicine and biology*, 816, 335-360.
- Glaviano, A., Foo, A. S., Lam, H. Y., Yap, K. C., Jacot, W., Jones, R. H., Eng, H., Nair, M. G., Makvandi, P., Georger, B., Kulke, M. H., Baird, R. D., Prabhu, J. S., Carbone, D., Pecoraro, C., Teh, D. B. L., Sethi, G., Cavalieri, V., Lin, K. H., Javidi-Sharifi, N. R., Toska, E., Davids, M. S., Brown, J. R., Diana, P., Stebbing, J., Fruman, D. A., Kumar, A. P., 2023. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular cancer*, 22(1), 138.
- Gong, L., Zhang, Y., Liu, C., Zhang, M., Han, S., 2021. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy. *International journal of nanomedicine*, 1083-1102.
- Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., Liu, C., 201). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular cancer*, 18(1), 1-17.

- Green, D. R. and Llambi, F., 2015. Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12), a006080.
- Gregor, A., Inage, T., Hwangbo, B., Yasufuku, K., 2020. Lung cancer staging: state of the art in the era of ablative therapies and surgical segmentectomy. *Respirology*, 25(9), 924-932.
- Grewal, P. and Viswanathan, V. A., 2012. Liver cancer and alcohol. *Clinics in liver disease*, 16(4), 839-850.
- Guan, X., 2015. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta pharmaceutica sinica B*, 5(5), 402-418.
- Günaydın, Ş., Sulukoğlu, E. K., Kalın, Ş. N., Altay, A., Budak, H., 2023. Diffractic acid exhibits thioredoxin reductase 1 inhibition in lung cancer A549 cells. *Journal of Applied Toxicology*, 43(11), 1676-1685.
- Hanahan, D. And Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hao, Y., Baker, D., Ten Dijke, P., 2019. TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2767.
- Haraldsdóttir, S., Guðlaugsdóttir, E., Ingólfssdóttir, K., Ögmundsdóttir, 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.
- Hausman, D. M., 2019. What is cancer? *Perspectives in biology and medicine*, 62(4), 778-784.
- Hazafa, A., Rehman, K. U., Jahan, N., Jabeen, Z., 2020. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. *Nutrition and cancer*, 72(3), 386-397.
- He, L., Wu, Y., Lin, L., Wang, J., Wu, Y., Chen, Y., Yi, Z., Liu, M., Pang, X., 2011. Hispidulin, a small flavonoid molecule, suppresses the angiogenesis and growth of human pancreatic cancer by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Cancer science*, 102(1), 219-225.
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., Boshoff, C., 2018. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446-454.
- Hermans, D., Rodriguez-Mogeda, C., Kemps, H., Bronckaers, A., Helga, E., Broux, B., 2023. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*, 26(3), 349-362.
- Heuson, J. C. and Legros, N., 1972. Influence of insulin deprivation on growth of the 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary carcinoma in rats subjected to alloxan diabetes and food restriction. *Cancer research*, 32(2), 226-232.
- Hollander, M. C., Maier, C. R., Hobbs, E. A., Ashmore, A. R., Linnoila, R. I., Dennis, P. A., 2011. Akt1 deletion prevents lung tumorigenesis by mutant K-ras. *Oncogene*, 30(15), 1812-1821.
- Holmgren, L., O'reilly, M. S., Folkman, J., 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature medicine*, 1(2), 149-153.
- Hope, C., Planutis, K., Planutiene, M., Moyer, M. P., Johal, K. S., Woo, J., Santoso, C., Hanson, J. A., Holcombe, R. F., 2008. Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention. *Molecular nutrition & food research*, 52(1), 52-61.

- Hori, M., Tanaka, H., Wakai, K., Sasazuki, S., Katanoda, K., 2016. Secondhand smoke exposure and risk of lung cancer in Japan: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Japanese journal of clinical oncology*, 46(10), 942-951.
- Hotchkiss R. S., Strasser A., McDunn J. E., Swanson, P. E., 2009. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570-1583.
- Hu, J., Cao, J., Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Zhang, B., Shen, J., Cai, L., Cai, X., Chen, M., 2021. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *Journal of hematology & oncology*, 14(1), 157
- Huang, P., Yan, R., Zhang, X., Wang, L., Ke, X., Qu, Y., 2019. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities. *Pharmacology & therapeutics*, 196, 79-90.
- Huneck, S., 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Die Naturwissenschaften*, 86(12), 559-570.
- Hutchinson, B. D., Shroff, G. S., Truong, M. T., Ko, J. P., 2019. Spectrum of lung adenocarcinoma. In *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 40(3), 255-264.
- Inoue, M., Sawabata, N., Okumura, M., 2012. Surgical intervention for small-cell lung cancer: what is the surgical role?. *General thoracic and cardiovascular surgery*, 60(7), 401-405.
- Iwai, S., Yonekawa, A., Harada, C., Hamada, M., Katagiri, W., Nakazawa, M., Yura, Y., 2010. Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *International journal of oncology*, 37(5), 1095-1103.
- Jamil, A. and Mukkamalla S. K. R., 2021. Lymphoma. *StatPearls*, Treasure Island (FL).
- Janiszewska, M., Primi, M. C., Izzard, T., 2020. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *Journal of biological chemistry*, 295(8), 2495-2505.
- Jeong, S., Afroz, S., Kang, D., Noh, J., Suh, J., Kim, J. H., You, H. J., Kang, H. G., Kim, Y. J., Kim, J. H., 2023. Sarcoma Immunotherapy: Confronting Present Hurdles and Unveiling Upcoming Opportunities. *Molecules and Cells*, 46(10), 579-588.
- Ji, Q., Liu, X., Fu, X., Zhang, L., Sui, H., Zhou, L., Sun, J., Cai, J., Qin, J., Ren, J., Li, Q., 2013. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ β -catenin signal pathway. *PloS one*, 8(11), e78700.
- Jiang, X. M., Yu, X. N., Liu, T. T., Zhu, H. R., Shi, X., Bilegsaikhan, E., Guo, H. Y., Song, G. Q., Weng, S. Q., Huang, X. X., Dong, L., Janssen, H. L. A., Shen, X. Z., Zhu, J. M., 2018. microRNA-19a-3p promotes tumor metastasis and chemoresistance through the PTEN/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 1147-1154.
- Johnson, S. M., Gulhati, P., Rampy, B. A., Han, Y., Rychahou, P. G., Doan, H. Q., Weiss, H. L., Evers, B. M., 2010. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *Journal of the American College of Surgeons*, 210(5), 767-776.
- Jones, G. S. and Baldwin, D. R., 2018. Recent advances in the management of lung cancer. *Clinical Medicine*, 18(2), 41-46.
- Ju, X., Katiyar, S., Wang, C., Liu, M., Jiao, X., Li, S., Zhou, J., Turner, J., Lisanti, M. P., Russell, R. G., Susette, C. M., Ojeifo, J., Chen, S. C., Hay, N., Pestell, R. G., 2007. Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7438-7443.

- Kalın, Ş. N., Altay, A., Budak, H., 2022. Diffractaic acid, a novel TrxR1 inhibitor, induces cytotoxicity, apoptosis, and antimigration in human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 361, 109984.
- Kalın, Ş. N., Altay, A., Budak, H., 2022. Inhibition of thioredoxin reductase 1 by vulpinic acid suppresses the proliferation and migration of human breast carcinoma. *Life Sciences*, 310, 121093.
- Karagoz, A., Dogruoz, N., Zeybek, Z., Aslan, A., 2009. Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12),1034–1039.
- Karagoz, I. D., Ozaslan, M., Kilic, I. H., Guler, I., Uyar, C., Tuter, D., Kazanci, U., Aslan, A., Çakır, A., Gezici, S., 2015. Hepatoprotective effect of diffractaic acid on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(5), 1011-1016.
- Kashyap, D., Garg, V. K., Goel, N., 2021. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 125, 73-120.
- Katsurada, A., Hagiwara, Y., Miyashita, K., Satou, R., Miyata, K., Ohashi, N., ... & Kobori, H., 2007. Novel sandwich ELISA for human angiotensinogen. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(3), F956-F960.
- Kendziorra, E., Ahlborn, K., Spitzner, M., Rave-Fränk, M., Emons, G., Gaedcke, J., Kramer, F., Wolff, H. A., Becker, H., Beissbarth, T., Ebner, R., Ghadimi, B. M., Pukrop, T., Ried, T., Grade, M., 2011. Silencing of the Wnt transcription factor TCF4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis*, 32(12), 1824-1831.
- Kim, S. Y., Dunn, I. F., Firestein, R., Gupta, P., Wardwell, L., Repich, K., Schinzel, A. C., Wittner, B., Silver, S. J., Root, D. E., Boehm, J. S., Ramaswamy, S., Lander, E. S., Hahn, W. C., 2010. CK1 ϵ is required for breast cancers dependent on β -catenin activity. *PloS one*, 5(2), e8979.
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y., 2016. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, 37(7), 8471-8486.
- Klimowski, L. K., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Virshup, D. M., 2006. Site-specific casein kinase 1 ϵ -dependent phosphorylation of Dishevelled modulates β -catenin signaling. *The FEBS journal*, 273(20), 4594-4602.
- Koparal, A. T., 2015. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)-usnic acid and vulpinic acid. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(5-6), 159-164.
- Koparal, A. T., Ulus, G., Zeytinoğlu, M., Tay, T., Türk, A. Ö., 2010. Angiogenesis inhibition by a lichen compound olivetoric acid. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24(5), 754-758.
- Kosanić, M. and Ranković, B., 2011. Antioxidant and antimicrobial properties of some lichens and their constituents. *Journal of Medicinal Food*, 14(12), 1624-1630.
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., Dolznig, H., 2013. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752(1), 10-24.
- Kulik, L. and El-Serag, H. B., 2019. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 156(2), 477-491.
- La Mendola, D., Trincavelli, M. L., Martini, C., 2022. Angiogenesis in disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10962.

- Lee, G. T., Rosenfeld, J. A., Kim, W. T., Kwon, Y. S., Palapattu, G., Mehra, R., Kim, W. J., Kim, I. Y., 2019. TCF4 induces enzalutamide resistance via neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *PloS one*, 14(9), e0213488.
- Lee, Y. R., Chen, M., Pandolfi, P. P., 2018. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(9), 547-562.
- Li, H., Zeng, J., Shen, K., 2014. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 290(6), 1067-1078.
- Li, X., Wang, X., Gao, P., 2017. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma. *BioMed research international*, 2017(1), 5202684.
- Li, Y., Bavarva, J. H., Wang, Z., Guo, J., Qian, C., Thibodeau, S. N., Golemis, E. A., Liu, W. 2011. HEF1, a novel target of Wnt signaling, promotes colonic cell migration and cancer progression. *Oncogene*, 30(23), 2633-2643.
- Liam, C. K., Andarini, S., Lee, P., Ho, J. C. M., Chau, N. Q., Tscheikuna, J., 2015. Lung cancer staging now and in the future. *Respirology*, 20(4), 526-534.
- Lien, E. C., Lyssiotis, C. A., Cantley, L. C., 2016. Metabolic reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR pathway in cancer. *Metabolism in Cancer*, 207, 39-72.
- Lim, S. and Kaldis, P., 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093.
- Lin, A. V., 2015. Indirect elisa. *ELISA: methods and protocols*, 51-59.
- Lin, S. R., Chang, C. H., Hsu, C. F., Tsai, M. J., Cheng, H., Leong, M. K., Sung, P. J., Chen, J. C., Weng, C. F. (2020). Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *British journal of pharmacology*, 177(6), 1409-1423.
- Liu, L. J., Xie, S. X., Chen, Y. T., Xue, J. L., Zhang, C. J., Zhu, F., 2016. Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 22(33), 7486-7499.
- Liu, Z. L., Chen, H. H., Zheng, L. L., Sun, L. P., Shi, L., 2023. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 198.
- Liu, Z., Jiang, Y., Yuan, H., Fang, Q., Cai, N., Suo, C., Jin, L., Zhang, T., Chen, X., 2019. The trends in incidence of primary liver cancer caused by specific etiologies: Results from the Global Burden of Disease Study 2016 and implications for liver cancer prevention. *Journal of Hepatology*, 70(4), 674-683.
- Lloyd, J. M., McIver, C. M., Stephenson, S. A., Hewett, P. J., Rieger, N., Hardingham, J. E., 2006. Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells. *Clinical Cancer Research*, 12(2), 417-423.
- Long, N. H. and Lee, S. J., 2023. Targeting casein kinase 1 for cancer therapy: current strategies and future perspectives. *Frontiers in Oncology*, 13, 1244775.
- Luo, J., Chen, J., Deng, Z. L., Luo, X., Song, W. X., Sharff, K. A., Tang, Ni., Haydon, R. C., Luu, H., H., He, T. C., 2007. Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?. *Laboratory investigation*, 87(2), 97-103.
- Lutzoni, F. and Miadlikowska, J., 2009. Lichens. *Current Biology*, 19(13), 502-503.

- Mahimainathan, L. and Choudhury, G. G., 2004. Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15258-15268.
- Malumbres, M. and Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews cancer*, 9(3), 153-166.
- Manning, B. D. and Toker, A., 2017. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*, 169(3), 381-405.
- Manojlovic, N. T., 2020. Isolation, identification, thermal analysis, DFT calculations and antioxidant activity studies of lichen metabolites norstictic acid and evernic acid Abstract. *Egyptian Journal of Chemistry*, 63(11), 4589-4605.
- Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F., & Hirsch, E., 2014. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of medicine*, 46(6), 372-383.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., White, E., 2007. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(12), 961-967.
- Matthews, H. K., Bertoli, C., de Bruin, R. A., 2022. Cell cycle control in cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(1), 74-88.
- Mazzoni, S. M., Fearon, E. R., 2014. AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers. *Cancer letters*, 355(1), 1-8.
- McKillop, I. H. and Schrum, L. W., 2005. Alcohol and liver cancer. *Alcohol*, 35(3), 195-203.
- Mederacke, I., Hsu, C. C., Troeger, J. S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D. H., Pradere, J. P., Schwabe, R. F., 2013. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nature communications*, 4(1), 2823.
- Mishra, R., Patel, H., Alanazi, S., Kilroy, M. K., & Garrett, J. T., 2021. PI3K inhibitors in cancer: clinical implications and adverse effects. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3464.
- Miwa, S., Yamamoto, N., Tsuchiya, H., 2023. Sarcoma: molecular pathology, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5833.
- Mohammadi, M., Zambare, V., Malek, L., Gottardo, C., Suntutres, Z., Christopher, L., 2020. Lichenochemicals: extraction, purification, characterization, and application as potential anticancer agents. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(5), 575-601.
- Montoto, S., Davies, A. J., Matthews, J., Calaminici, M., Norton, A. J., Amess, J., Vinnicombe, S., Waters, R., Rohatiner, A. Z. S., Lister, T. A. 2007. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25(17), 2426-2433.
- Mugnaini, E. N. and Ghosh, N., 2016. Lymphoma. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 43(4), 661-675.
- Mullangi, S. and Lekkala, M. R., 2020. Adenocarcinoma. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Mun, E. J., Babiker, H. M., Weinberg, U., Kirson, E. D. and Von Hoff, D. D., 2018. Tumor-treating fields: a fourth modality in cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 24(2), 266-275.
- Naeem, A., Hu, P., Yang, M., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, W., Zheng, Q., 2022. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. *Molecules*, 27(23), 8367.

- Nahta, R., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Andrade-Vieira, R., Bay, S. N., Brown, D. G., Calaf, G. M., Castellino, R. C., Cohen-Solal, K. A., Colacci, A., Cruickshanks, N., Dent, P., Di Fiore, R., Forte, S., Goldberg, G. S., Hamid, R. A., Krishnan, H., Laird, D. W., Lasfar, A., Marignani, P. A., Memeo, L., Mondello, C., Naus, C. C., Ponce-Cusi, R., Raju, J., Roy, D., Roy, R., Ryan, E. P., Salem, H. K., Scovassi, A. I., Singh, N., Vaccari, M., Vento, R., Vondráček, J., Wade, M., Woodrick, J., Bisson, W. H., 2015. Mechanisms of environmental chemicals that enable the cancer hallmark of evasion of growth suppression. *Carcinogenesis*, 36(1); 2-18.
- Nair, J., Nair, A., Veerappan, S., Sen, D., 2020. Translatable gene therapy for lung cancer using Crispr CAS9—an exploratory review. *Cancer gene therapy*, 27(3), 116-124.
- Najafi, S. M. A., 2020. Canonical wnt signaling (Wnt/ β -Catenin Pathway): A potential target for cancer prevention and therapy. *Iranian biomedical journal*, 24(5), 269-280
- Najafov, A., Chen, H., Yuan, J., 2017. Necroptosis and cancer. *Trends in cancer*, 3(4), 294-301.
- Nasereldin, D. S., White, L. J., Hodge, D. O., Roberts, L. R., Patel, T., Antwi, S. O., 2022. Association of metabolic health phenotypes, obesity, and hepatocellular carcinoma risk. *Digestive and Liver Disease*, 54(7), 964-972.
- Nasim, F., Sabath, B. F., Eapen, G. A., 2019. Lung Cancer. *Medical Clinics of North America*, 103(3), 467-473.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M., 2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, 83(3), 770-803.
- Newton, K., Strasser, A., Kayagaki, N., Dixit, V. M., 2024. Cell death. *Cell*, 187(2), 235-256.
- Nguyen, D. X., Chiang, A. C., Zhang, X. H. F., Kim, J. Y., Kris, M. G., Ladanyi, M., Gerald, W. L., Massagué, J., 2009. WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell*, 138(1), 51-62.
- Nguyen, N. P., Vos, P., Vinh-Hung, V., Borok, T. L., Dutta, S., Karlsson, U., Lee, H., Martinez, T., Jo, B. H., Nguyen, L. M., Nguyen, N., Sallah, S., 2009. Altered glucose metabolism during chemoradiation for head and neck cancer. *Anticancer research*, 29(11), 4683-4687.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., Kojiro, M., 2006. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213-219.
- Nishita, M., Saji, T., Minami, Y., 2019. Non-canonical Wnt signaling and cellular responses. *Clinical Calcium*, 29(3), 291-297.
- Nooreldeen, R. and Bach, H., 2021. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16):8661.
- Novikov, N. M., Zolotaryova, S. Y., Gautreau, A. M., Denisov, E. V., 2021. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer*, 124(1), 102-114.
- Nunes, C. D. R., Barreto Arantes, M., Menezes de Faria Pereira, S., Leandro da Cruz, L., de Souza Passos, M., Pereira de Moraes, L., Vieira, I. J. C., Barros de Oliveira, D. (2020). Plants as sources of anti-inflammatory agents. *Molecules*, 25(16), 3726.

- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., Bao, J. K., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45(6), 487-498.
- Paluszczak, J., Kleszcz, R., Studzińska-Sroka, E., Krajka-Kuźniak, V., 2018. Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 441(1-2), 109-124.
- Papadimitrakopoulou, V., 2012. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(8), 1315-1326.
- Papierska, K., Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Kleszcz, R., Skalski, M., Studzińska-Sroka, E., & Baer-Dubowska, W., 2021. Lichen-derived depsides and depsidones modulate the Nrf2, NF- κ B and STAT3 signaling pathways in colorectal cancer cells. *Molecules*, 26(16), 4787.
- Parangi, S., O'Reilly, M., Christofori, G., Holmgren, L., Grosfeld, J., Folkman, J., & Hanahan, D., 1996. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(5), 2002-2007.
- Park, J. H., Pyun, W. P., Park, H. W., 2020. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*, 9(10):2308.
- Park, S., Hatanpaa, K. J., Xie, Y., Mickey, B. E., Madden, C. J., Raisanen, J. M., Ramnarain, D. B., Xiao, G., Saha, D., Boothman, D. A., Zhao, D., Bachoo, R. M., Pieper, R. O., Habib, A. A., 2009. The receptor interacting protein 1 inhibits p53 induction through NF- κ B activation and confers a worse prognosis in glioblastoma. *Cancer research*, 69(7), 2809-2816.
- Pascal, L. E., True, L. D., Campbell, D. S., Deutsch, E. W., Risk, M., Coleman, I. M., Eichner, L. J., Nelson, P. S., Liu, A. Y., 2008. Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC genomics*, 9, 1-13.
- Pasic, I. and Lipton, J. H., 2017. Current approach to the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia research*, 55, 65-78.
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., Hoyer, D., 2016. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug discovery today*, 21(2), 204-207.
- Paździora, W., Podolak, I., Grudzińska, M., Paśko, P., Grabowska, K., Galanty, A., 2023. Critical Assessment of the Anti-Inflammatory Potential of Usnic Acid and Its Derivatives—A Review. *Life*, 13(4), 1046.
- Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S. A., Haywood, P., Brown, C., Ward, R., 2017. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PloS one*, 12(10), e0184360.
- Pérez-Herrero, E. and Fernández-Medarde, A., 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 93, 52-79.
- Pez, F., Lopez, A., Kim, M., Wands, J. R., de Fromental, C. C., Merle, P., 2013. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *Journal of hepatology*, 59(5), 1107-1117.
- Pfeffer, C. M. and Singh, A. T., 2018. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- Pimentel, E. (2020). *Oncogenes*. CRC Press.

- Porta, C., Paglino, C., Mosca, A., 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in oncology*, 4, 64.
- Poulsen-Silva, E., Gordillo-Fuenzalida, F., Atala, C., Moreno, A. A., Otero, M. C., 2023. Bioactive lichen secondary metabolites and their presence in species from Chile. *Metabolites*, 13(7), 805.
- Rajabi, M. and Mousa, S. A., 2017. The role of angiogenesis in cancer treatment. *Biomedicines*, 5(2), 34.
- Reyna-Jeldes, M., Díaz-Muñoz, M., Madariaga, J. A., Coddou, C., & Vázquez-Cuevas, F. G., 2021. Autocrine and paracrine purinergic signaling in the most lethal types of cancer. *Purinergic Signalling*, 17(3), 345-370.
- Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., & Mitchell, M. J., 2019. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature reviews Drug discovery*, 18(3), 175-196.
- Rim, E. Y., Clevers, H., Nusse, R., 2022. The Wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators. *Annual review of biochemistry*, 91(1), 571-598.
- Rodriguez, N., Yang, J., Hasselblatt, K., Liu, S., Zhou, Y., Rauh-Hain, J. A., Ng, S. K., Choi, P. W., Fong, W. P., Agar, N. Y. R., Welch, R., Berkowitz, R. S., Ng, S. W. (2012). Casein kinase I epsilon interacts with mitochondrial proteins for the growth and survival of human ovarian cancer cells. *EMBO molecular medicine*, 4(9), 952-963.
- Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E., Wistuba, I. I., 2016. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. In *Cancer Treatment and Research* 170, 25–46.
- Roehlen, N., Crouchet, E., Baumert, T. F., 2020. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells*, 9(4), 875.
- Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., Sage, J., 2021. Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 3.
- Russo, A., Caggia, S., Piovano, M., Garbarino, J., Cardile, V., 2012. Effect of vicinidin and protolicheterinic acid on human prostate cancer cells: role of Hsp70 protein. *Chemico-biological interactions*, 195(1), 1-10.
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Vanella, L., Cardile, V., 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.
- Salahshor, S. and Woodgett, J. R., 2005. The links between axin and carcinogenesis. *Journal of clinical pathology*, 58(3), 225-236.
- Salazar, A., Velázquez-Soto, H., Ayala-Balboa, J., Jiménez-Martínez, M. C., & Salazar, A. 2017. Allergen-based diagnostic: Novel and old methodologies with new approaches. In *Allergen*. IntechOpen.
- Schambony, A. and Wedlich, D., 2013. Wnt signaling and cell migration. In *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Landes Bioscience.
- Schmalhofer, O., Brabletz, S., Brabletz, T., 2009. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28, 151-166.
- Schulze, A. and Harris, A. L., 2012. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*, 491(7424), 364-373.
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., Maiti, P., 2018. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal transduction and targeted therapy*, 3(1), 7.

- Senga, S. S. and Grose, R. P., 2021. Hallmarks of cancer—the new testament. *Open biology*, 11(1), 200358.
- Shrestha, G. and St. Clair, L. L., 2013. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry reviews*, 12, 229-244.
- Sica, G. L. and Gal, A. A., 2012. Lung cancer staging: pathology issues. In *Seminars in Diagnostic Pathology*, 29(3), 116-126.
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., Ahsan, H., 2015. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of toxicology*, 89, 289-317.
- Simpson, L. and Parsons, R., 2001. PTEN: life as a tumor suppressor. *Experimental cell research*, 264(1), 29-41.
- Song, M. S., Salmena, L., Pandolfi, P. P., 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(5), 283–296.
- Song, M., Bode, A. M., Dong, Z., Lee, M. H., 2019. AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer research*, 79(6), 1019-1031.
- Stanojković, T., 2019. Investigations of lichen secondary metabolites with potential anticancer activity. *Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential*, 155-174.
- Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U. C., Pasparakis, M., Offermanns, S., 2016. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*, 536(7615), 215-218.
- Su, Z. Q., Mo, Z. Z., Liao, J. B., Feng, X. X., Liang, Y. Z., Zhang, X., Liu, Y. H., Chen, X. Y., Chen, Z. W., Su, Z. R., 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.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q., 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*, 14, 1-14.
- Sulukoğlu, E. K., Günaydın, Ş., Kalın, Ş. N., Altay, A., Budak, H., 2024. Diffraactaic acid exerts anti-cancer effects on hepatocellular carcinoma HepG2 cells by inducing apoptosis and suppressing migration through targeting thioredoxin reductase 1. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1-11.
- Sun, E. J., Wankell, M., Palamuthusingam, P., McFarlane, C., Hebbard, L., 2021. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Biomedicines*, 9(11), 1639.
- Sun, K., Luo, J., Guo, J., Yao, X., Jing, X., Guo, F., 2020. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthritis and cartilage*, 28(4), 400-409.
- Sun, W., Shi, Q., Zhang, H., Yang, K., Ke, Y., Wang, Y., Qiao, L., 2019. Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy. *Discovery medicine*, 27(146), 45-55.
- Sutherland, K. D. and Berns, A., 2010. Cell of origin of lung cancer. *Molecular oncology*, 4(5), 397-403.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., Jaffe, E. S., 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(20), 2375-2390.

- Tai, Q., Zhang, L. and Hu, X., 2020. Clinical characteristics and treatments of large cell lung carcinoma: a retrospective study using SEER data. *Translational Cancer Research*, 9(3), 1455.
- Tanese, K., 2019. Diagnosis and management of basal cell carcinoma. *Current treatment options in oncology*, 20(2), 13.
- Taniai, M., 2020. Alcohol and hepatocarcinogenesis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 26(4), 736.
- Tewari, D., Patni, P., Bishayee, A., Sah, A. N., Bishayee, A., 2022. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy. In *Seminars in cancer biology*, 80,1-17.
- Tian, Q., Stepaniants, S. B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M. C., Doyle, M. J., Yi, E. C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J. P., Gunter, B., Linseley, P. S., Stoughton, R. B., Aebersold, R., Collins, S. J., Hanlon, W. A., Hood, L. E. (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(10), 960-969.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., Beer, D. G., Powell, C. A., Riely, G. J., Van Schil, P. E., Garg, K., Austin, J. H. M., Asamura, H., Rusch, V. W., Hirsch, F. R., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R. M., Ishikawa, Y., Jett, J., Sanchez-Cespedes, M., Sculier, J. P., Takahashi, T., Tsuboi, M., Vansteenkiste, J., Wistuba, I., Yang, P. C., Aberle, D., Brambilla, C., Flieder, D., Franklin, W., Gazdar, A., Gould, M., Hasleton, P., Henderson, D., Johnson, B., Johnson, D., Kerr, K., Kuriyama, K., Lee, J. S., Miller, V. A., Petersen, I., Roggli, V., Rosell, R., Saijo, N., Thunnissen, E., Tsao, M., Yankelewitz, D., 2011. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification, 6(2), 244-85.
- Tripathi, A. H., Negi, N., Gahtori, R., Kumari, A., Joshi, P., Tewari, L. M., Joshi, Y., Bajpai, R., Upreti, D. K., Upadhyay, S. K., 2022. A review of anti-cancer and related properties of lichen-extracts and metabolites. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 22(1), 115-142.
- Truong, T. L., Nga, V. T., Huy, D. T., Chi, H. B., Phung, N. K., 2014. A new depside from *Usnea aciculifera* growing in Vietnam. *Natural product communications*, 9(8), 1179-1180.
- Tu, F., Li, M., Chen, Y., Chu, H., Wang, S., Hai, L., Xie, T., Geng, F., Zhao, T., Wang, Q., Feng, Z., 2022. Let-7i-3p inhibits the cell cycle, proliferation, invasion, and migration of colorectal cancer cells via downregulating CCND1. *Open Medicine*, 17(1), 1019-1030.
- Valenta, T., Hausmann, G., Basler, K., 2012. The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO journal*, 31(12), 2714-2736.
- Van Meerbeeck, J. P., Fennell, D. A., De Ruyscher, D. K., 2011. Small-cell lung cancer. *The Lancet*, 378(9804), 1741-1755.
- Vandermoere, F., El Yazidi-Belkoura, I., Demont, Y., Slomianny, C., Antol, J., Lemoine, J., Hondemarck, H., 2007. Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(1), 114-124.
- Varol, M., 2018. Anti-breast cancer and anti-angiogenic potential of a lichen-derived small-molecule: barbatolic acid. *Cytotechnology*, 70(6), 1565-1573.

- Vazquez, A., Kamphorst, J. J., Markert, E. K., Schug, Z. T., Tardito, S., Gottlieb, E., 2016. Cancer metabolism at a glance. *Journal of cell science*, 129(18), 3367-3373.
- Vidyarthi, A., Agarwal, R., Gupta, D., Sharma, R., Draheim, D., & Tiwari, P. (2022). Machine learning assisted methodology for multiclass classification of malignant brain tumors. *IEEE Access*, 10, 50624-50640.
- Waisberg, J., & Saba, G. T. (2015). Wnt/ β -catenin pathway signaling in human hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology*, 7(26), 2631.
- Wan, G., Liu, Y., Zhu, J., Guo, L., Li, C., Yang, Y., Gu, X., Deng, L. L., Changlian, Lu, C., 2019. SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway. *Cellular Signalling*, 59, 1-12.
- Wang, M., Yang, Y., Liao, Z., 2020. Diabetes and cancer: Epidemiological and biological links. *World journal of diabetes*, 11(6), 227.
- Wang, Y., Zhang, T., He, X., 2023. Advances in the role of microRNAs associated with the PI3K/AKT signaling pathway in lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 13, 1279822.
- Wang, Z., Li, Z., Ji, H., 2021. Direct targeting of β -catenin in the Wnt signaling pathway: Current progress and perspectives. *Medicinal research reviews*, 41(4), 2109-2129.
- Wethalawe, A. N., Alwis, Y. V., Udukala, D. N., Paranagama, P. A., 2021. Antimicrobial compounds isolated from endolichenic fungi: a review. *Molecules*, 26(13), 3901.
- White, P. A., Oliveira, R. C., Oliveira, A. P., Serafini, M. R., Araújo, A. A., Gelain, D. P., Moreira, J. C. F., Almeida, J. R. G. S., Quintans, J. S. S., Quintans-Junior, L. J., Santos, M. R. V., 2014. Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: A systematic review. *Molecules*, 19(9), 14496-14527.
- Wild, S. L., Elghajji, A., Grimaldos Rodriguez, C., Weston, S. D., Burke, Z. D., Tosh, D. 2020. The canonical Wnt pathway as a key regulator in liver development, differentiation and homeostatic renewal. *Genes*, 11(10), 1163.
- Wittekind, C. and Neid, M., 2005. Cancer invasion and metastasis. *Oncology*, 69 (Suppl. 1), 14-16.
- Woodard, G. A., Jones, K. D., Jablons, D. M., 2016. Lung cancer staging and prognosis. *Lung cancer: treatment and research*, 47-75.
- Xu, J. J., Zhang, W. C., Guo, Y. W., Chen, X. Y., Zhang, Y. N., 2022. Metal nanoparticles as a promising technology in targeted cancer treatment. *Drug Delivery*, 29(1), 664-678.
- Xu, K., Liu, P., & Wei, W. (2014). mTOR signaling in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1846(2), 638-654.
- Xu, X., Zhang, M., Xu, F., Jiang, S., 2020. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Molecular cancer*, 19(1), 165.
- Yadav, N., Kumar, P., Chhikara, A., Chopra, M., 2017. Development of 1, 3, 4-oxadiazole thione based novel anticancer agents: Design, synthesis and in-vitro studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 721-730.
- Yan, F., Ma, Y., Liu, L., Li, L., Deng, J., Sun, J., 2020. Long noncoding RNA HOXD-AS1 promotes the proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer via the miR-526b-3p/CCND1 axis. *Journal of Surgical Research*, 255, 525-535.

- Yan, M., Li, G., An, J., 2017. Discovery of small molecule inhibitors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting β -catenin/Tcf4 interactions. *Experimental biology and medicine*, 242(11), 1185-1197.
- Yang, W. S. and Stockwell, B. R., 2008. Inhibition of casein kinase 1-epsilon induces cancer-cell-selective, PERIOD2-dependent growth arrest. *Genome biology*, 9, 1-13.
- Yang, Y., Sun, M., Wang, L., Jiao, B., 2013. HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 114(5), 967-974.
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Barreira da Silva, R., Reis e Sousa, C., Green, D., R., Oberst, A., Albert, M. L., 2015. RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8+ T cells. *Science*, 350(6258), 328-334.
- Ye, L. C., Jiang, C., Bai, J., Jiang, J., Hong, H. F., Qiu, L. S., 2015. Knockdown of casein kinase 1E inhibits cell proliferation and invasion of colorectal cancer cells via inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Regul Homeost Agents*, 29(2), 307-315.
- Yu, H. and Li, S. B., 2020. Role of LINC00152 in non-small cell lung cancer. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 21(3), 179-191.
- Yu, H., Pardoll, D., Jove, R., 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*, 9(11): 798-809.
- Yu, L., Wei, J., Liu, P., 2022. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer. In *Seminars in cancer biology*, 85, 69-94. Academic Press.
- Yuan, C. H. A. O., Zhang, X. J., Du, Y. D., Guo, Y. H., Sun, L. Y., Ren, Q., Zhao, Z. T., 2010. Antibacterial compounds and other constituents of *Evernia divaricata* (L.) Ach. *J Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 32(2), 189-193.
- Zambare, V. P., Christopher, L. P., 2012. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50(6), 778-798.
- Zhao, M., Mishra, L., Deng, C. X., 2018. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *International journal of biological sciences*, 14(2), 111.
- Zhang, M., Zhang, L., Hei, R., Li, X., Cai, H., Wu, X., Zheng, Q., Cai, C., 2021. CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *American journal of cancer research*, 11(5), 1913.
- Zheng, H., Ke, X., Li, D., Wang, Q., Wang, J., Liu, X., Deng, M., Deng, X., Xue, Y., Zhu, Y., Wang, Q. (2018). NEDD4 promotes cell growth and motility in hepatocellular carcinoma. *Cell Cycle*, 17(6), 728-738.
- Zhong, Z. and Virshup, D. M., 2020. Wnt signaling and drug resistance in cancer. *Molecular pharmacology*, 97(2), 72-89.
- Zhou, Q., Lui, V. W., Yeo, W., 2011. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future oncology*, 7(10), 1149-1167.
- Zhou, Y., Xu, J., Luo, H., Meng, X., Chen, M., Zhu, D., 2022. Wnt signaling pathway in cancer immunotherapy. *Cancer letters*, 525, 84-96.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Berna HUKKAMLI
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Nene Hatun Kız Lisesi
Lisans:	Erzurum Teknik Üniversitesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	