



**İNSAN KARACİĞER KANSER HÜCRE HATTI
ÜZERİNE LİKEN ASİTLERİNİN TİYOREDOKSİN
REDÜKTAZ HEDEFLİ ANTİKANSER ETKİSİNİN GEN
VE PROTEİN SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI**

Emine KARACA

**Danışman: Prof. Dr. Harun BUDAK
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
2021
(Her hakkı saklıdır.)**

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

**İNSAN KARACİĞER KANSER HÜCRE HATTI ÜZERİNE LİKEN ASİTLERİNİN
TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ HEDEFLİ ANTİKANSER ETKİSİNİN GEN VE
PROTEİN SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of Thioredoxin Reductase Targeted Anticancer Effect of Lichen Acids on
Human Liver Cancer Cell Line at Gene and Protein Levels)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine KARACA

Danışman: Prof. Dr. Harun BUDAK

Erzurum

Temmuz, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Emine KARACA tarafından hazırlanan “İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Tioredoksin Redüktaz Hedefli Antikanser Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması” başlıklı çalışması 09 / 07 / 2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Genetik Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Harun BUDAK
Atatürk Üniversitesi
Danışman: Prof. Dr. Harun BUDAK
Atatürk Üniversitesi
Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
Atatürk Üniversitesi
Jüri Üyesi: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ
Erzurum Teknik Üniversitesi

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 TÜBİTAK 1002 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 119Z112

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 SAYFASI

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Harun BUDAK danışmanlığında sunulan “İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Tioredoksin Redüktaz Hedefli Antikanser Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması” 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	3	30
Kuramsal Temeller	2	30
Materyal ve Yöntem	12	35
Bulgular	2	20
Tartışma	0	20
Tezin Geneli	5	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
Emine KARACA	Prof. Dr. Harun BUDAK
28.7.2021	28.7.2021
İmza:	İmza:

* 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

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) ve bu çalışmayı, 119Z112 numaralı “Likin Asitlerinin İnsan Akciğer ve Karaciğer Kanseri Hücre Hatları Üzerine Tioredoksin Redüktaz Hedefli Antikanser Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması” başlıklı proje ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1002-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı'na teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde her türlü bilimsel yönlendirmeleri ile yardım ve destekte bulunan, bilgi ve tecrübelerinden her daim faydalandığım çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Harun BUDAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda tüm deney süreçlerinde yol göstererek yardımda bulunan ve benimle değerli bilgilerini paylaşan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ahmet ALTAY'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürüttüğüm Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) Müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e ve DAYTAM'da görev yapan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSİN ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aslı YILMAZ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın her türlü aşamasında her türlü imkânı sağlayan ve fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkanlarını esirgemeyen Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve Kimya Bölümü'ne teşekkür ederim. Ayrıca Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında bana yardım eden Sayın Arş. Gör. Dr. Pınar GÜLLER'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatma Necmiye KACI'ya, Sayın Şeyda Nur KALIN'a, Sayın Aslıhan BASTEM'e, Sayın Şükran GÜNAYDIN'a, Sayın Fatmanur KELEŞ'e, Sayın Betül ARI'ya ve diğer grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca her daim maddi ve manevi destekleriyle varlıklarını yanımda hissettiğim başta annem olmak üzere çok değerli aile üyelerime sonsuz teşekkür ederim.

Emine KARACA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN KARACİĞER KANSER HÜCRE HATTI ÜZERİNE LİKEN ASİTLERİNİN TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ HEDEFLİ ANTİKANSER ETKİSİNİN GEN VE PROTEİN SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI

Emine KARACA

Danışman: Prof. Dr. Harun BUDAK

Amaç: Bu tez çalışmasında, insan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattında bazı liken asitlerinin (evernik, vulpinik, difraktaik, lekanorik) antikanser etkilerinin belirlenmesi ve olası etkilerin tiyoredoksin redüktaz 1 (TRXR1) hedefli olup olmadığının gen ve protein seviyesinde incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: Bahsedilen liken asitlerinin HepG2 hücreleri üzerine doz ve zaman bağımlı antiproliferatif etkileri XTT testi ile belirlendi. Bu liken asitlerinin apoptoz ve migrasyon üzerine etkileri, Annexin V-FITC ve yara izi deneyleriyle incelendi. Real-Time PCR yöntemiyle tiyoredoksin sistem üyelerinden tiyoredoksin (TXN) ve TRXR1'in ve apoptotik yolak genlerinden BAX, BCL2, P53'ün kantitatif ekspresyonu üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca bu liken asitlerinin TRXR1 enzim aktivitesi ve kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisi, DTNB ve western blot yöntemleriyle araştırıldı.

Bulgular: Belirtilen liken asitlerinden evernik, vulpinik ve difraktaik asitlerinin HepG2 kanser hücreleri üzerine doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etkilerinin olduğu gözlemlendi. Üç liken asidinin migrasyonu baskıladığı görülürken, sadece vulpinik ve difraktaik asitlerinin apoptozu indüklediği belirlendi. Vulpinik asidin BAX/BCL2 oranını arttırdığı, P53 geninin ekspresyonunu azalttığı saptandı. Difraktaik asidin ise apoptotik yolak genlerinden sadece P53 geninin ekspresyonunu arttırdığı belirlendi. Vulpinik ve difraktaik asidin tiyoredoksin sistem genlerinden TXN ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmadığı, TRXR1 geninde ise önemli bir artış oluşturduğu gözlemlendi. Evernik asit ise belirtilen genlerin ekspresyonlarında önemli bir değişiklik oluşturmadı. Üç liken asidi de TRXR1 kantitatif protein ekspresyonunu arttırdığı görüldü. Buna karşın, vulpinik ve difraktaik asidin enzim aktivitesini baskılarken evernik asidin enzim aktivitesini arttırdığı belirlendi.

Sonuç: HepG2 hücreleri üzerine evernik, vulpinik ve difraktaik liken asitleri antikanser etki göstermektedir. Vulpinik ve difraktaik asit bu antikanser etkiyi TRXR1 hedefli olarak gerçekleştirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer kanseri, Liken asidi, Kemoterapötik ajan, Tiyoredoksin redüktaz 1, Enzim aktivitesi.

Temmuz 2021, 125 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF THIOREDOXIN REDUCTASE TARGETED ANTICANCER EFFECT OF LICHEN ACIDS ON HUMAN LIVER CANCER CELL LINE AT GENE AND PROTEIN LEVELS

Emine KARACA

Supervisor: Prof. Dr. Harun BUDAK

Purpose: In this thesis, it was aimed to determine the anticancer effects of some lichen acids (evernic, vulpinic, diffractaic, and lecanoric) on human liver (HepG2) cancer cell line and whether this possible anticancer effect was occurred by thioredoxin reductase 1 (TRXR1)-targeted at gene and protein levels.

Method: The dose- and time-dependent antiproliferative effects of the aforementioned lichen acids on HepG2 cells were determined by XTT assay. The effects of these lichen acids on apoptosis and migration were investigated by Annexin V-FITC and wound healing assays, respectively. The effects of these lichen acids on the expression of thioredoxin system members thioredoxin (TXN) and TRXR1 and apoptotic pathway genes BAX, BCL2, P53 were determined by Real-Time PCR method. Furthermore, the effects of the aforementioned lichen acids on the enzyme activity and the quantitative protein expression of TRXR1 were examined by DTNB method and western blot, respectively.

Findings: It was observed that evernic, vulpinic, and diffractaic lichen acids have dose- and time-dependent antiproliferative effects on HepG2 cancer cells. Although three lichen acids were found to suppress migration, it was determined that only vulpinic and diffractaic acid induced apoptosis. While vulpinic acid increased the BAX/BCL2 ratio and decreased the expression of the P53 gene, diffractaic acid increased only P53 expression. It was shown that vulpinic and diffractaic acids did not cause significant change in the expression of the TXN gene, but a notable increase was seen in the TRXR1 expression. Evernic acid did not show remarkable change in the expression of these genes. It was indicated that three lichen acids increased the TRXR1 quantitative protein expression. On the other hand, while vulpinic and diffractaic acid inhibited the activity of TRXR1, evernic acid induced the activity of TRXR1.

Results: Evernic, vulpinic, and diffractaic acids exhibit anticancer effects on HepG2 cells. Vulpinic and diffractaic acids display this anticancer effect by targeting TRXR1.

Keywords: Liver cancer, Lichen acid, Chemotherapeutic agent, Thioredoxin reductase 1, Enzyme activity.

July 2021, 125 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ.....	1
Kanser	1
Kanser nedenleri.....	2
Kanser tedavi yöntemleri	5
Hepatoselüler Karsinom ve Etiyolojisi	7
Hepatoselüler karsinom tanı ve tedavisi	9
Reaktif Oksijen Türleri	11
Süperoksit.....	14
Peroksinitrit	15
Hidrojen peroksit.....	15
Hidroksil radikali	16
Lipid peroksitler	16
Oksidatif stres	17
Reaktif oksijen türlerinin kanser üzerindeki etkisi.....	19
Antioksidan Savunma Sistemleri	20
Süperoksit temizleme mekanizması.....	21
Peroksinitrit temizleme mekanizması	21
Hidrojen peroksit temizleme mekanizması.....	22
Bazı enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerinin reaktif oksijen türlerini temizleme mekanizmaları	24
Antioksidan savunma sistemlerinin kanserle ilişkisi	24
Tiyoredoksin Sistem	25
Tiyoredoksin	26
Tiyoredoksin redüktaz.....	28

Tiyoredoksin etkileşimli protein	30
Tiyoredoksin sistem ve kanser	30
Likenler	32
Likenler tarafından üretilen metabolitler	34
Liken sekonder metabolitlerinin genel etkileri	36
KURAMSAL TEMELLER.....	41
MATERYAL VE METOT.....	49
Kullanılan Kimyasallar	49
Kullanılan Materyal ve Cihazlar	50
Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	52
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Muamelesi ve Antikanser Etkisinin İncelenmesi	53
Liken asitlerinin hazırlanması	53
HepG2 kanser hücrelerinin kültüre edilmesi.....	54
Hücre proliferasyonu testi	55
Apoptoz testi	57
Migrasyon testi.....	59
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Muamelesinin Ardından Tiyoredoksin Sistem Üyelerinden TXN ve TRXR1 ve Apoptotik Yolak Genlerinden BAX, BCL2, P53 için Ekspresyon Analizi	61
mRNA izolasyonu	61
cDNA sentezi	62
Primer dizaynı	63
Kantitatif gen ekspresyon analizi	69
Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistikî analizler	70
Protein Ekspresyon Analizi (Western Blot).....	71
Hücrelerden total proteinin ekstrakte edilmesi	71
Bradford (Coomassie blue) protein tayini.....	71
SDS Jelinin hazırlanması ve yüklenmesi	73
Jelde yürütülen proteinlerin membrana transfer (blotlama), bloklanma ve görüntülenme basamakları	74
Tiyoredoksin Redüktaz Enzim Aktivite Ölçümü.....	76
ARAŞTIRMA BULGULARI	79
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattı Üzerinde Liken Asitlerinin Antiproliferatif Etkileri	79

İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattında Liken Asitlerinin Apoptoz ve Migrasyon Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	87
İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında liken asitlerinin apoptotik etkisinin flow (akım) sitometrik analizi ile değerlendirilmesi	87
İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattının liken asitleri ile muamelesi sonrası migrasyon analiz sonuçları.....	90
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattında Liken Asitlerinin Tioredoksin, Tioredoksin Redüktaz 1 ve Apoptoz İlişkili Genlerin Kantitatif Ekspresyon Seviyelerine Etkisi	92
Kantitatif gen mRNA ekspresyon analiz sonuçları	93
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattında Liken Asitlerinin Tioredoksin Redüktaz 1 Proteinin Kantitatif Ekspresyon Seviyesine Etkileri.....	99
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattında Liken Asitlerinin Tioredoksin Redüktaz 1 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	100
TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER.....	103
Tartışma ve Sonuç.....	103
Sonuç ve Öneriler.....	111
KAYNAKLAR.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	126

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	49
Tablo 2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyaller.....	50
Tablo 3. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar.....	51
Tablo 4. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	52
Tablo 5. cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri ve Hacimsel Miktarları.....	63
Tablo 6. Gen Ekspresyon Profillerine Bakılan Genler için Dizayn Edilen Primerlerin Listesi	69
Tablo 7. Bir Tüp için Real-Time PCR Reaksiyon Karışımı ve Pipetleme Prosedürü	69
Tablo 8. SYBR Green Real-Time PCR Protokolü.....	70
Tablo 9. Standart Grafik Oluşturmak için Deney Tüplerine Eklenen Farklı Konsantrasyondaki BSA Çözelti Karışımı	72
Tablo 10. Bradford Protein Tayinin Uygulanma Prosedürü	73
Tablo 11. SDS Jel Elektroföresi için Kullanılacak Ayırma Jeli Değerleri	73
Tablo 12. SDS Jel Elektroföresi için Kullanılacak Yükleme Jeli Değerleri... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Tablo 13. TRXR1 Enzim Aktivite Ölçümü için Kullanılan Reaktif Karışım İçeriği	77
Tablo 14. Liken Asitlerinin (Evernik Asit, Vulpinik Asit, Difraktaik Asit ve Lekanorik Asit) HepG2 Hücre Hattı Üzerinde 24 ve 48 Saat Muameleleri Sonrası Hesaplanan IC ₅₀ (µg/mL) Değerleri	87
Tablo 15. Liken Asitlerinin (Evernik Asit, Vulpinik Asit ve Difraktaik Asit) İnsan Karaciğer (HepG2) Hücre Hatları Üzerindeki Erken, Geç ve Toplam Apoptotik (%) Değerleri	90
Tablo 16. HepG2 Kanseri Hücrelerine Ait Kontrol Grubundan ve Liken Asitleri ile Muamele Gruplarından İzole Edilen Total RNA'ların Saflık Dereceleri ve Konsantrasyon Miktarları	92
Tablo 17. Total RNA Örneklerinden Sentezlenen cDNA Örneklerinin Saflık Dereceleri ve Konsantrasyon Miktarları	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser türlerinde görülen ortak özellikler	2
Şekil 2. Kanser gelişimine katkı sağlayan endojen ve ekzojen faktörler	3
Şekil 3. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 yılına ait dünyadaki kanser türlerinin insidans ve ölüm oranları ve karaciğer kanserinin istatistiksel verileri	7
Şekil 4. Hepatoselüler karsinom gelişimi.....	8
Şekil 5. Hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinin hücresel fonksiyonlarda etkisi.....	12
Şekil 6. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) endojen ve eksojen kaynakları.....	13
Şekil 7. Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS).....	17
Şekil 8. Artan ROS/RNS'nin kaynakları ve oluşan oksidatif stres durumu.....	18
Şekil 9. Reaktif oksijen türlerinin kanser gelişimine katkısı.....	20
Şekil 10. Enzimatik antioksidan savunma sistemleri tarafından hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi	24
Şekil 11. Tioredoksin (Trx) sisteminin hücrelerdeki düzenleyici etkileri.....	27
Şekil 12. Sitozolik ve mitokondriyal tioredoksin (TXN1 ve TXN2) proteinlerinin yapıları .	28
Şekil 13. Sitozolik ve mitokondriyal tioredoksin redüktaz (TRXR1 ve TRXR2) proteinlerinin yapıları.....	29
Şekil 14. Tioredoksin (Trx) sisteminin etki mekanizması	30
Şekil 15. Kanserde tioredoksin (Trx) sistemin rolü	31
Şekil 16. Mikobiyont ve fotobiyontun simbiyotik birlikteliği ile oluşan liken hayatının şematik gösterimi	32
Şekil 17. Liken sekonder metabolitlerinin yapısal dağılımlarının gösterimi	35
Şekil 18. Liken simbiyotik yaşama ait kısımlar	36
Şekil 19. Liken metabolitlerinin olası antikanser mekanizmalarının şematik gösterimi.	39
Şekil 20. Evernik asidin kimyasal yapısı ve 3 boyutlu (3D) yapısının gösterimi	42
Şekil 21. Vulpinik asidin kimyasal yapısı ve 3D yapısının gösterimi	43
Şekil 22. Difraktaik asidin kimyasal yapısı ve 3D yapısının gösterimi	45
Şekil 23. Lekanorik asidin kimyasal yapısı ve 3D yapısının gösterimi	46
Şekil 24. İnsan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattının mikroskop görüntüsü	54
Şekil 25. XTT testi için 96 kuyucuklu plakadaki hücrelere kontrol ve liken asitlerinin muamele edilme prosedürü.	56
Şekil 26. Annexin V FITC / PI kit içeriğindeki boyaların çalışma prensibi	58
Şekil 27. Yara iyileştirme (wound healing assay) testinin prosedürü	60
Şekil 28. Primer dizaynında gen bilgisine ulaşmak için kullanılan NCBI anasayfası	64

Şekil 29. Yapılan arama sonucunda açılan gen ile ilgili dizilimlerin verildiği NCBI sayfası .	64
Şekil 30. İlgili genin nükleotit dizilimine ulaşılabilir bağlantı linkinin yer aldığı NCBI sayfasının görüntüsü	65
Şekil 31. Primer dizaynı yapılacak gene ait nükleotit sekansının verildiği internet sayfasının görüntüsü.....	65
Şekil 32. Primerin dizayn edildiği veri tabanı	66
Şekil 33. Primer dizaynı için gerekli olan bilgilerin girildiği veritabandaki ilgili alanlar	67
Şekil 34. Veritabanı tarafından ilgili gen için önerilen primerlerin nükleotit dizilimlerinin ve özelliklerin verildiği sayfanın görüntüsü	67
Şekil 35. İlgili gene ait primerlerin başka genlerle homolojisinin araştırılacağı Nucleotide BLAST veri tabanı	68
Şekil 36. İlgili gene ait primerlerin başka genlerle homolojisinin gösterildiği blast sonuçları	68
Şekil 37. Western blot tekniğinin şematize gösterimi	76
Şekil 38. Evernik asidin doz (125-200 µg/mL) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	80
Şekil 39. Evernik asidin doz (25-250 µg/mL) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	81
Şekil 40. Vulpinik asidin doz (10-150 µg/mL) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	82
Şekil 41. Vulpinik asidin doz (10-100 µg/mL) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	83
Şekil 42. Difraktaik asidin doz (10-250 µg/mL) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	84
Şekil 43. Difraktaik asidin doz (10-200 µg/mL) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	85
Şekil 44. Lekanorik asidin doz (10-250 µg/mL) ve zaman bağımlı (24 saat) olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	86
Şekil 45. Evernik asidin insan karaciğer HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri	88
Şekil 46. Vulpinik ve difraktaik asitlerinin insan karaciğer HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri	89
Şekil 47. Liken asitlerinin insan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattı üzerindeki migrasyon etkileri	91
Şekil 48. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve evernik asit ile muamele grubunda TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları	94

Şekil 49. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve evernik asit ile muamele grubunda BAX, BCL2 genlerinin ve BAX/BCL2 oranının mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları	94
Şekil 50. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve evernik asit ile muamele grubunda P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesine ait Real-Time PCR sonuçları	95
Şekil 51. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve vulpinik asit ile muamele grubunda TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları	95
Şekil 52. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve vulpinik asit ile muamele grubunda BAX, BCL2 genlerinin ve BAX/BCL2 oranının mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları	96
Şekil 53. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve vulpinik asit ile muamele grubunda P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesine ait Real-Time PCR sonuçları	97
Şekil 54. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve difraktaik asit ile muamele grubunda TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları	97
Şekil 55. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve difraktaik asit ile muamele grubunda BAX, BCL2 genlerinin ve BAX/BCL2 oranının mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları	98
Şekil 56. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve difraktaik asit ile muamele grubunda P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesine ait Real-Time PCR sonuçları	99
Şekil 57. Liken asitlerinin HepG2 kanser hücre hattında TRXR1'in kantitatif protein ekspresyon seviyesi üzerine etkisi	99
Şekil 58. Liken asitleri ile muamele edildikten sonra elde edilen HepG2 hücrelerinin mikroskop görüntüleri	100
Şekil 59. Evernik asidin HepG2 kanser hücrelerinde TRXR1'in enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	101
Şekil 60. Vulpinik asidin HepG2 kanser hücrelerinde TRXR1'in enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	101
Şekil 61. Difraktaik asidin HepG2 kanser hücrelerinde TRXR1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	102

Şekil 62. Hepatoselüler karsinom hücrelerinde tiyoredoksin redüktaz 1'in vulpinik ve difraktaik asit tarafından inhibisyonunun hücredeki çeşitli yollar üzerine etkisinin şematize edilmesi	111
--	-----



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

P53	: Tümör protein 53
HCC	: Hepatoselüler karsinom
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
HBV	: Hepatit B
HBC	: Hepatit C
AFB1	: Aflatoksin B1
AFP	: α -fetoprotein
OKT	: Ortotopik karaciğer transplantasyonu
MELD Skoru	: Model for End-Stage Liver Disease
TACE	: Transarteriyel kemoembolizasyon
RFA	: Radyofrekans ablasyon
PEI	: Perkütan etanol enjeksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
O₂	: Moleküler oksijen
ETC	: Elektron taşıma zinciri
LOX	: Lipoksijenazlar
XO	: Ksantin oksidaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NOX	: NADPH oksidaz
•OH	: Hidroksil radikali
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
O₂•⁻	: Süperoksit radikali
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
HOCl	: Hipokloröz asit
O₃	: Ozon
¹O₂	: Singlet oksijen
ONOO⁻	: Peroksinitrit anyonu
ONOOH	: Peroksinitröz asit
NO	: Nitrik oksit
NO₂⁻	: Nitrit anyonu
•NO₂	: Nitrojen dioksit
NO₃⁻	: Nitrat anyonu
SOD	: Süperoksit dismutaz
Mn-SOD	: Manganez süperoksit dismutaz

Cu/Zn-SOD	: Bakır-çinko süperoksit dismutaz
N₂O₃	: Dinitrojen trioksit
ER	: Endoplazmik retikulum
Cat	: Katalaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
GSSG	: Oksitlenmiş glutasyon
PRDX	: Preoksiredoksin
Fe⁺²	: Demir
Fe⁺³	: Ferrik
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
LOO•	: Lipid peroksit radikalleri
L•	: Lipid radikalleri
LOOH	: Lipid peroksit
Trx	: Tioredoksin sistem
TXN	: Tioredoksin
TXN1	: Sitozolik tioredoksin
TXN2	: Mitokondriyal tioredoksin
Trx – (SH)₂	: İndirgenmiş tioredoksin
Trx – S₂	: Oksitlenmiş tioredoksin
TRXR	: Tioredoksin redüktaz
TRXR1	: Sitozolik tioredoksin redüktaz
TRXR2	: Mitokondriyal tioredoksin redüktaz
TXNIP	: Tioredoksin etkileşimli protein
Cys	: Sistein
Sec	: Selenosistein
ASK1	: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1
IC₅₀	: Hücre proliferasyonunu %50 azaltmak için gereken konsantrasyon

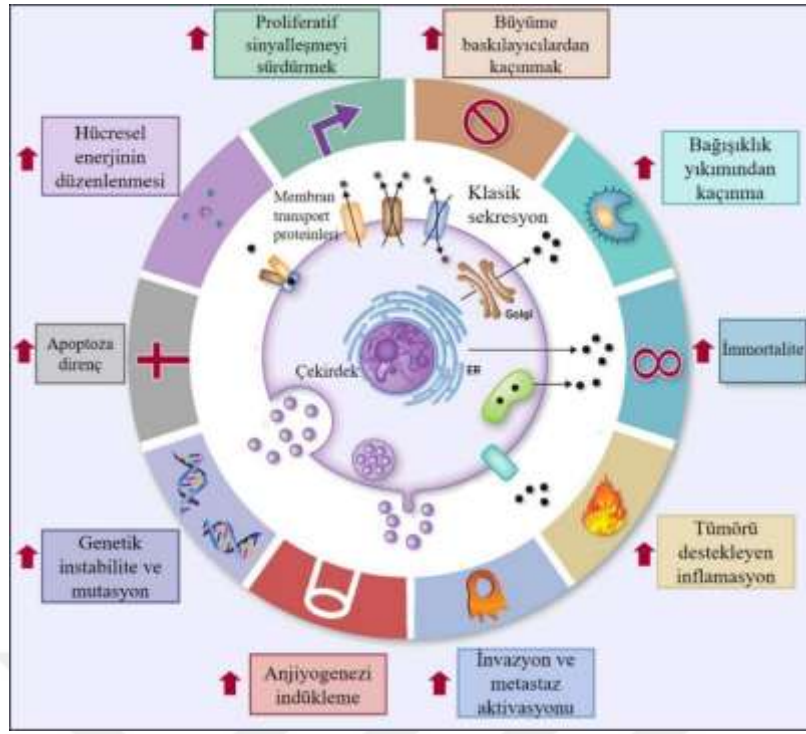
GİRİŞ

Kanser

Kanser, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasına yol açan gen ve protein ekspresyonundaki çoklu değişikliklerin neden olması sonucu hücrelerin kontrolsüz ve anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması ile ortaya çıkan çoğunlukla ölümcül bir hastalıktır. Kanserde değişen bu anormal gen ekspresyonu; gen mutasyonu, translokasyonu, amplifikasyonu, silinmesi, heterozigotluk kaybı veya anormal gen transkripsiyonundan veya translasyonundan kaynaklanan bir mekanizma gibi doğrudan DNA'ya müdahale yoluyla meydana gelebilir. Bunun sonucu olarak, normal dokulardaki hücre çoğalması ve hücre kaybı arasındaki denge durumunun aksine tümör dokusunun genişlemesine yol açan bir tümör hücresi popülasyonunda hücre çoğalması ve hücre ölümü dengesizliği oluşur. Böylece sağlıklı hücreler, invazif karaktere sahip ve olduğu bölgelerden uzak bölgelere kan ve lenfatik sistemler yoluyla metastaz yapabilen bir tümör hücre popülasyonuna dönüşerek ciddi morbiditeyle ve tedavi edilmezse konakçının ölümüyle sonuçlanır (Bali *et al.* 2010; Ruddon 2007).

Klinik bir bakış açısına göre kanser; kanser başlangıç yaşı, büyüme hızı, hücresel farklılaşma durumu, tanısal tespit edilebilirlik, invazif karakter, metastatik potansiyel, tedavi ve prognoz cevabına göre değişen belki de yüz veya daha fazla türü olan büyük bir hastalık grubudur (Ruddon 2007). Kanser, farklı fenotipik özelliklere sahip birçok farklı hastalık gibi görünse de insanın bağışıklık sistemini bozması, göç etmesi, evrimleşmesi, organları işgal etmesi, dokuları tahrip etmesi ve ilaçlara direnç göstermesi gibi pek çok ortak özellik içerir (Mukherjee 2010).

Kanser hücrelerinin genetik instabilitesi, sıklıkla daha embriyonik bir fenotipin belirli özelliklerine sahip zayıf şekilde farklılaşmış hücrelerin ortaya çıkması ile karakterize olan daha agresif şekilde büyüyen bir tümörün ortaya çıkmasına neden olur. Tümör ilerlemesi sırasında, tüm kanserli hücrelerin başlangıçta tek bir bozulmuş hücreden ortaya çıkmış olmasına rağmen, büyüyen tümörde ve bu tümörün metastazlarında belirgin biyokimyasal heterojenite meydana gelir. Hücre antijenitesi, invazif karakter, metastatik potansiyel, hücre çoğalması hızı, farklılaşma durumu ve kemoterapötik maddelere tepki gibi özelliklerle oluşan bu hücre heterojenitesi, hücre popülasyonundaki genetik sürüklenme ile ortaya konulabilir (Şekil 1) (Ruddon 2007).



Şekil 1. Kanser türlerinde görülen ortak özellikler (Modifiye edilmiştir.) (Bonnin *et al.* 2018)

Kanser ne kadar kötü bir hastalık olarak nitelendirilse de aslında tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere iki temel tipe ayrılır ve bu iki tip tümör arasında ayırım yapabilme yeteneği, tümörü olan bir hastanın uygun tedavisini ve prognozunu belirlemede çok önemlidir (Vanita *et al.* 2011). Malign bir tümörü iyi huylu bir tümörden ayıran özellikler, bölgesel olarak dokuları istila edip tahrip etme, bölgesel lenf nodlarına yayılma ve vücuttaki uzak organlara metastaz yapma yetenekleridir. Ayrıca malign tümörler iyi huylu tümörlere kıyasla daha hızlı büyürler ve ortaya çıktıkları dokuda köken aldıkları normal hücrelere daha az benzerlik (anaplastik eğilim) gösterme eğilimindedirler. Genel olarak bu malign tümörler, önemli morbiditeye neden olur ve tedavi edilmezse konakçıda öldürücü olurlar (Ruddon 2007).

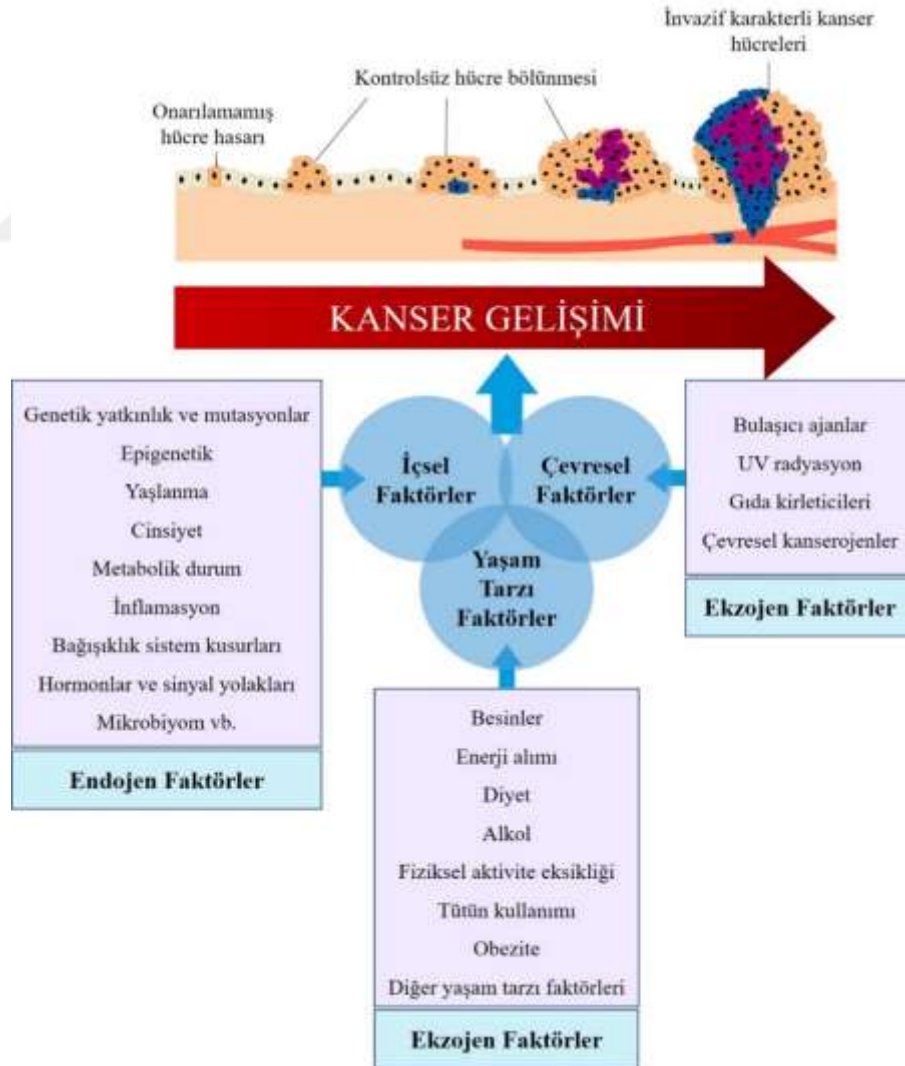
Kanser her yaşta ortaya çıkabilse de genellikle yaşı ilerlemiş insanlarda görülen bir hastalık olarak kabul edilir. Kanser teşhisi sırasındaki ortalama yaş 67'dir ve tüm kanserlerin yaklaşık %76'sı 55 yaş ve üstünde teşhis edilir. Kanser çocuklarda nispeten nadir olmasına rağmen, 1-14 yaş arası çocuklarda ikinci sırada ölüm nedenidir. Bu yaş grubunda lösemi en sık ölüm nedenidir, ancak osteosarkom, nöroblastom, Wilms tümörü (nefroblastom) ve lenfoma gibi diğer kanserler de ortaya çıkar (Siegel *et al.* 2019).

Kanser nedenleri

Pek çok durumda, kanserin spesifik nedenleri açıkça tanımlanmamıştır, ancak hem dış (örneğin çevresel kimyasallar ve radyasyon) hem de iç (örneğin, bağışıklık sistemi kusurları, genetik yatkınlık) faktörlerin kanserin ortaya çıkmasında rol oynadığı belirlenmiştir (Clapp *et*

al. 2008; May *et al.* 2020; Van Cutsem & Arends 2005). Bu nedensel faktörler, başlangıçta genetik müdahale ile karsinogenezi başlatmak ve kanserli hale gelmeye başlayan hücrelerin büyümesinin uyarılması ile karsinogenezi teşvik etmek için birlikte hareket edebilir (Vanita *et al.* 2011).

Çeşitli kanserlerin insidans oranları, çevresel faktörler ve yaşam tarzı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Örneğin tütün kullanımı, alkol alımı, zayıf beslenme, obezite, UV radyasyonuna maruz kalma ve fiziksel aktivite eksikliği gibi kansere neden olan birçok risk kansere neden olabilir. Böylece akciğer, böbrek, karaciğer, beyin gibi farklı organlar bu faktörlerden bazılarının etkisinde kalarak neoplastik hücreler meydana gelebilir (May *et al.* 2020; Vanita *et al.* 2011). Kanserlerin çoğu çevresel faktörler ve yaşam tarzı ile ilişkilendirilse de insanlar hastalıktan %5 oranında kalıtsal olarak etkilenme riski taşımaktadır. İç faktörler bu kalıtsal riskleri de kapsamakla birlikte yaşlanma ile hücrelerde biriken reaktif oksijen türleri (ROS) ve çoklu mutasyonlar, genetik yatkınlık, DNA onarım mekanizmalarındaki hatalar ve bu mekanizmaların bozulması da kansere neden olabilir (Şekil 2) (Ruddon 2007).



Şekil 2. Kanser gelişimine katkı sağlayan endojen ve ekzojen faktörler (Modifiye edilmiştir.) (May *et al.* 2020)

Kanserlerin çoğu, tespit edilen 100'den fazla kimyasal, fiziksel ve biyolojik kanserojenler ile DNA'sı müdahaleyle değiştirilmiş olabilecek tek bir hücre klonundan köken alır. Malign kanserler de bir insanın DNA'sında ömür boyu “vuruş” (mutasyon) birikiminden kaynaklanmaktadır (Loeb 1991). Bu vuruşlar (mutasyonlar); kimyasal karsinojenler (örneğin aldehitler ve formaldehit, Etidyum bromür vb.), radyasyon, viral (örneğin Hepatit B ve C, Epstein-Barr, Human papilloma virüsleri), bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlar gibi çevresel ajanlara karşı veya ROS gibi endojen olarak üretilen ajanlara karşı genetik duyarlılıktan kaynaklanabilir (Sabharwal & Schumacker 2014; Sudhakar & therapy 2009).

Bir hücrenin kanserli hale gelmesi veya en azından kanser olma yolunda ilk adımların atılması için en az iki genetik vuruşun gerekli olduğunu söylemek yeterlidir. Biri kalıtsal olabilirken biri doğumdan sonra tahakkuk edebilir veya her ikisi de doğumdan sonra tahakkuk edebilir. Bu şekilde genetik vuruşların meydana geldiği genler, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden hücrenin kontrol ve dengelerinde bir kayıp meydana getirir. Örneğin büyüme faktörleri gibi sinyal moleküllerini kodlayan proto-onkogenler, normal bir hücrenin büyümesini teşvik ederler. Bu genlerde meydana gelebilecek bir mutasyon, normal genleri onkogen haline getirir. Böylece aktif olan onkogenler hücrelerin aşırı ve düzensiz hücre proliferasyonuna neden olur (Cantara *et al.* 2010). Kanser gelişimine katkı sağlayan bir diğer gen grubundaki mutasyonlar ise tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilecek mutasyonlardır. Tümör baskılayıcı genler, hücrelerin aşırı büyümesini önlerler. Bir hücre aşırı derecede bölünmeye başlarsa, komşu hücreler bölünmeyi durdurmak için engelleyici faktörler gönderir. Bu faktörler, ya doğrudan hücreye etki eder ya da sürekli bölünen hücrede engelleyici faktörlerin oluşumunu tetikler. Tümör baskılayıcı gen olarak adlandırılan bu genlerde bir ya da daha fazla mutasyon gerçekleşmesi kanser hücresinin gelişiminde kilit bir aşamayı temsil eder ve artık aktif olmayan veya silinen bu tümör baskılayıcı genler, hücrelerin komşu hücreler tarafından gönderilen uyarılarını görmezden gelmesine neden olur. Mutasyonlar, engelleyici faktörler için bir hücre yüzeyi reseptörünü ya da sinyali alan ve işleyen hücre içindeki basamakların kritik (kilit) bir bileşenini yok edebilir. DNA zarar görürse veya sinyal yolları kontrolden çıkarsa diğer mutasyonlar, hücreyi apoptoz geçirmeye tetikleyen tümör protein p53 (P53) gibi proteinleri de devre dışı bırakabilir (Grandér 1998; Muller & Vousden 2014).

Bazı gen grupları ise mutasyon oluşturmada kanser gelişimine neden olurlar. Bu gen gruplarına anjiyogenik genler ve metastaz genleri örnek olarak verilebilir. Anjiyogenik genler, yeni kan damar oluşumlarını kontrol eden genlerdir. Anjiyogenezi süreci hem normal hücrelere hem de kanserli hücrelere besin ve oksijen sağlayan ve atık ürünleri uzaklaştıran kan damarları ağının çoğalması olayıdır. Tümör anjiyogenezi, aslında kanserli tümör hücrelerinin normal

konak dokuya sinyal gönderen molekülleri serbest bırakması ile başlar. Bu sinyal, konukçu dokudaki bazı genleri aktive ederek sırayla yeni kan damarlarının büyümesini teşvik eden proteinler oluşturur. Böylece kanserli hücreler yeni oluşturulan kan damarları ile geniş bir alana yayılmış olurlar (Folkman 1995; Tonini *et al.* 2003). Metastaz genleri ise kanserin yayılmasına neden olan genlerdir. Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden çevre dokulara ve uzak organlara yayılma niteliği olarak adlandırılır. Bu sürecin oluşumuna neden olan genlerin aktif olması ile kanser gelişimi desteklenmiş olur (Seyfried & Huysentruyt 2013).

Kansere sebep olan bu hücrel değişikliklerin asıl nedeni biliniyorsa, kanser üreten faktörlerin ortadan kaldırılması ve daha iyi tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi muhtemel olacaktır.

Kanser tedavi yöntemleri

Bütün kanser türleri için uygulanan tedavi yöntemleri standart olmakla birlikte tedavi süreci uzman hekimler tarafınca cerrahi, kemoterapi ve radyasyon tedavisi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu tedavi sürecinde cerrahi müdahaleden önce veya sonra, radyasyon tedavisi kullanılmadan kemoterapi işlemi uygulanabilir (Sudhakar & therapy 2009; Vanita *et al.* 2011).

Cerrahi yöntemler, kanser tedavisi için sıkça kullanılan bir tedavi yöntemi olup biyopsi, endoskopi, ultrasonografi ve açık cerrahi eksplorasyon kanseri tedavi etmek amacıyla kullanılan farklı cerrahi yöntemlerdir. Bu yöntemler arasında yer alan tümör lezyonlarını ameliyatla uzaklaştırma işlemi ise tedavi esnasında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Vanita *et al.* 2011). Kanserde kötü huylu tümörü iyi huylu bir tümörden veya neoplastik olmayan bir hastalıktan ayırıcı tanısını gerçekleştirmek için de genellikle biyopsi, cerrahi eksizyon veya eksfoliye sitoloji ile doku örneği alınır. Cerrahi yöntemlerle hastalardan tümörlü kısımların eksizyonunun yapılması kanserli kısımları en aza indirilebilse de bu yöntemle hastalığı tamamen tedavi etmek mümkün değildir ve bazı durumlarda ameliyattan sonra kanserli doku tekrar oluşumu gözlemlenebilir. Ayrıca kanserin metastaz ile yayılım göstermesi de cerrahi yöntemlerde sınırlamalar getirmiştir (Sudhakar & therapy 2009).

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek amacıyla antikanser ilaçlarının kullanıldığı işlem sürecini kapsayan bir tedavi yöntemidir. Bu zamana kadar birçok kemoterapi ilacının kullanımı, birçok kanser tipinin tedavisinde iyi ve başarılı sonuçlar vermesine karşın kemoterapi ilaçları bazı toksik yan etkilere neden olmaktadır. Örneğin kemoterapi, sadece kanser hücrelerini öldürmekle kalmayıp kemik iliğinde yeni kan hücreleri ve ağız, mide, deri, saç ve üreme organlarındaki hücreler gibi hızla büyüyen veya bölünen normal hücreleri de

etkileyebilmektedir. Bu şekilde normal hücrelerin hasar görmesi sonucunda ishal, bulantı ve hafıza kaybı gibi yan etkiler de ortaya çıkabilmektedir (Pearce *et al.* 2017). Ayrıca kemoterapi zorlayıcı yan etkilere neden olmasının yanı sıra bazı hastalarda kemoterapiye karşı direnç geliştirmesi ve kemoterapiden sonra vücudun bazı kısımlarında tekrar kanserin görülmesi yönünden kemoterapinin tedavideki etkinliğini sınırlamaktadır (Shrestha *et al.* 2015; Vanita *et al.* 2011). Kemoterapinin bu yan etkilerini azaltmak ve kemoterapötik ajanların yetersiz biyodağılımı sorununu çözmek için yeni yaklaşımlar üzerinde çalışılmakta ve yeni antikanser ajanlar aranmaktadır. Yeni ilaç kombinasyonları, spesifik kanser hücrelerini hedeflemek için lipozomal ve monoklonal antikor tedavisi, kemoterapi yan etkilerini azaltmak için kemoprotektif ajanlar, hematopoietik kök hücre transplantasyonu ve çoklu ilaç direncinin üstesinden gelen maddelerin geliştirilmesi bu yeni yaklaşımlara örnek olarak verilebilir (Sudhakar & therapy 2009).

Radyoterapi, hastalara X ışınları, gama ışınları ve yüklü parçacıklar uygulaması yapılarak kanser hücrelerini öldürmek amacıyla kanser tedavisinde kullanılan diğer bir yöntemdir. Konformal proton ışın tedavisi (proton ışınları, X-ışınları yerine tümör hücrelerini öldürmek için kullanılmaktadır); stereotaktik cerrahi ve stereotaktik tedavi (gamma bıçağı, beyin tümörünü tedavi etmek için kullanılabilir); intraoperatif radyasyon tedavisi (cerrahi müdahaleye müteakip dokulara radyasyon uygulaması) gibi çeşitli radyasyon terapileri kullanılmaktadır (Chen & Kuo 2017).

Son yıllarda, dünyadaki birçok bilim adamı çabalarını kanser çalışmalarına adanmış ve kanseri tedavi etmek için çeşitli terapiler geliştirmişlerdir. Örneğin hormonal tedavi, adjuvan terapi, tümör büyümesini kontrol etmek için vücudun kullandığı bazı doğal sinyalleri taklit eden biyolojik ajanların (interferonlar, interleokinler, sitokinler, endojen anjiyo-inhibitörler ve antijenler) kullanıldığı immünoterapi ve kanser hücrelerine daha spesifik ve etkili bir şekilde ilaçların çok küçük parçacıklar yardımıyla verildiği nanoteknoloji kanser tedavisinde etkili yöntemlerdir (Abraham & Staffurth 2016; Ellis *et al.* 2008; Khodabandehloo *et al.* 2016; Rescigno *et al.* 2007; Sudhakar & therapy 2009).

Kanser tedavisi için çözülmesi gereken birçok problem olmakla birlikte hem güvenli hem de etkili olan geçerli terapötik rejimlerin oluşturulması ve az sayıda yan etki, düşük toksisite ve yüksek antikanser potansiyeli olan antikanser ajanlarının belirlenmesi gerekmektedir (Hong *et al.* 2018).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, dünya genelinde kalp-damar hastalıklarından sonra gelen insan ölümünün ikinci önemli nedeni olan kanser, 2018'de 18,1 milyon yeni vaka ve 9,6 milyon kanser kaynaklı ölüm istatistiklerine sahiptir (Bray *et al.* 2018). 2020'de ise dünya genelinde

tahmini olarak 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 9,9 milyon kanser kaynaklı ölüm meydana gelmiştir. Bu sayının gelecek 20 yıl içinde 22 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Sung *et al.* 2021).

Hepatoselüler Karsinom ve Etiyolojisi

Karaciğerin primer malign tümörleri genellikle bilinen kronik karaciğer hastalığına bağlı olarak gelişirler ve karaciğer işlevlerinde bozulma ile birlikte ortaya çıkabilirler (Goldman & Ausiello 2008). Primer karaciğer kanserinin %90 gibi bir oranla önemli bir alt türü olan hepatoselüler karsinom (HCC), en sık görülen malign tümörlerden biri olmakla birlikte hepatositlerin malign dönüşümünden kaynaklanan epitelyal bir tümördür (Cheng *et al.* 2016). Erken tanısı zor olduğundan prognozu kötü olup dünya çapında görülme sıklığı açısından altıncı, ölüm nedeni açısından üçüncü sıradadır (Sung *et al.* 2021).

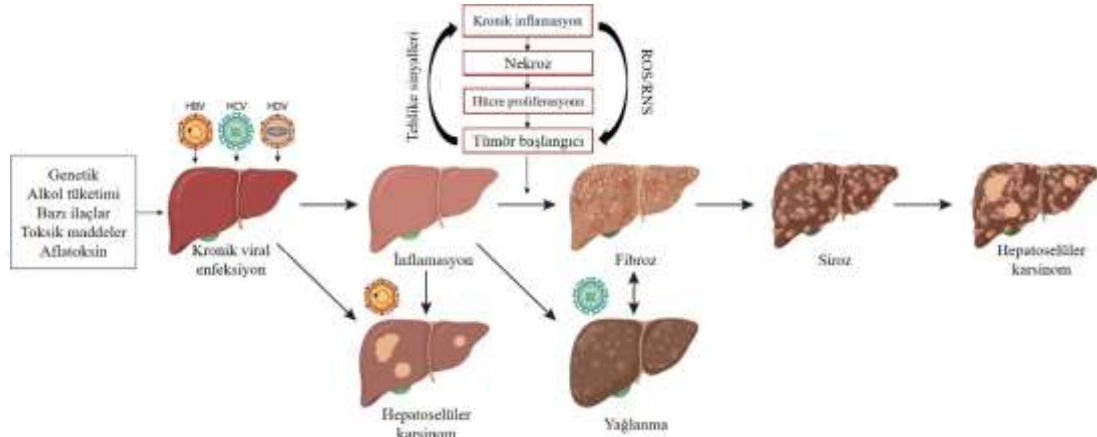
HCC tüm dünya üzerinde coğrafi değişkenlik gösteren heterojen etiyolojiye sahip bir hastalıktır ve en sık görülen ülkeler Güneydoğu Asya'daki ve Büyük Sahra altındaki ülkelerdir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün verilerine göre dünya genelinde ise 2018 yılında tahminen 841.080 yeni karaciğer kanseri vakası ve bundan dolayı 781.631 ölüm meydana gelmiştir ve HCC insidansı çarpıcı bir şekilde artmaktadır (Bray *et al.* 2018). 2020 yılında ise karaciğer kanserinde yaklaşık 906.000 yeni vaka ve 830.000 ölüm görülmüştür (Şekil 3) (Sung *et al.* 2021). HCC, kadınlara kıyasla dört kat fazla düzeyde olacak şekilde çoğunlukla erkeklerde görülmektedir ve yaşla birlikte bu risk artmaktadır. Genel olarak tüm hastalarda ise 5 yıllık sağkalım oranları olmakla beraber hastaların %5'inden fazlası 2 yıldan fazla hayatta kalamamaktadır. Ayrıca gelişmekte olan ülkelerde sağkalım oranları daha da düşüktür (Luo *et al.* 2017).



Şekil 3. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 yılına ait dünyadaki kanser türlerinin insidans ve ölüm oranları ve karaciğer kanserinin istatistiksel verileri (Sung *et al.* 2021)

HCC, özellikle Hepatit B ve C virüsleri ile kronik enfeksiyonlara bağlı kronik karaciğer hastalığı ve siroz zemininden gelişim göstermektedir. Bu gelişim, genelde karaciğer hücresi

hasarından sonra oluşan inflamasyon, hepatosit rejenerasyonu, karaciğer matrisinin yeniden biçimlenmesi, fibroz ve sonuç olarak oluşan siroz üzerinden gerçekleşmektedir (D'souza *et al.* 2020). Karaciğer sirozunun etiyolojisi çok çeşitli olup hepatit B (HBV), hepatit C (HCV), alkol tüketimi, bazı ilaçlar ve toksik madde maruziyeti ve genetik metabolik hastalıkları kapsamaktadır (Şekil 4) (Chabner *et al.* 2013; Goldman & Ausiello 2008). HCC genellikle sirotik zeminde gelişse de nadiren karaciğer hastalığı bulunmayan kişilerde de görülebilmektedir.



Şekil 4. Hepatoselüler karsinom gelişimi (Modifiye edilmiştir.) (D'souza *et al.* 2020)

Tüm dünyada HCC'lerin %80'i HBV ile enfekte olmuş insanlarda görülmektedir ve HBV enfeksiyonu, dünyada karaciğer kanserinin yaygın olduğu bölgelerde primer risk faktörüdür. HBV enfeksiyonunun HCC oluşturma riskini yüz kat arttırdığı tahmin edilmektedir. Ayrıca HBV enfeksiyonunda siroz insidansı yaklaşık %25-50'dir (Chabner *et al.* 2013).

HCV enfeksiyonu HCC'nin diğer bir ciddi risk faktörüdür. HCV ile enfekte olan hastaların %70-80'i kronik HCV enfeksiyonu ve %15-20'si siroz geliştirir. Siroz oluştuktan sonra yılda %1-4 oranında ve tüm kronik HCV enfeksiyonlu hastaların %5-10'unda HCC gelişmektedir (Chabner *et al.* 2013).

Aspergillus flavus ve *Aspergillus parasiticus* mantarları tarafından üretilen Aflatoksin B1 (AFB1) endemik bölgelerde HCC için risk faktörlerinden biridir. İnsanlar bu maddeyi, AFB1'i içeren pirinç, mısır, fıstık ve bu tür yiyecekleri yiyen hayvanların ürünlerini yiyerek alır. AFB1 maruziyetinin görüldüğü bölgelerde HCC'de P53 gen mutasyonu siktir ve P53 geninde özgün bir mutasyon saptanmıştır (Hsu *et al.* 1991).

HCC'ye neden olan başlıca risk faktörleri HBV ve HCV enfeksiyonu ve siroz olmakla beraber HCC'nin diğer risk faktörleri arasında aflatoksine maruz kalma, alkol tüketimi, hemokromatozis, A-1 antitripsin bozukluğu, herediter tirozinemi, porfiria kutunea tarda, Wilson hastalığı, alkole bağımlı olmayan steatohepatit (karaciğer yağlanması), anabolik

steroidler, östrojenler ve paraziter enfeksiyonlar (Schistosoma, Clonorchis, Echinococats, Opisthorchis gibi) yer almaktadır (Chabner *et al.* 2013; Goldman & Ausiello 2008; Ruddon 2007).

Karaciğer kanserlerinde moleküler genetik değişiklikler çeşitlidir ve muhtemelen bu değişiklikler çeşitli nedensel ajanları yansıtmaktadır. Örneğin, P53 mutasyonlarına sıklıkla rastlanmakla birlikte GTPaz proto-onkogen (K-Ras) mutasyonları ve siklin D1 amplifikasyonu sadece küçük bir hasta grubunda gözlenir. Diğer gözlenen genetik değişiklikler, siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A), insülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü (M6P/IGF2R), SMAD protein gen ailesi üyeleri ve siklin D ve A genlerinde görülmektedir (Ruddon 2007). HCC'ye neden olan risk faktörlerin başında gelen siroz da rejenerasyon nodüllerinde artmış DNA sentezi ve hücre proliferasyonuna yol açar; bunun sonucunda yapısal olarak bozuk düzenlemeler ve düzenleyici protein işlevlerinde azalma görülebilir. Kronik HBV enfeksiyonlarında viral DNA, hücre döngüsünü kontrol eden insan genomlarına entegre olarak tümör baskılayıcı genlerde mutasyon meydana getirerek bu genlerin çalışmasında sorunlar oluşturabilir veya onkogenleri harekete geçirebilir. Ayrıca HBV-gen ürünü de onkogenleri uyartabilir. Çevresel faktörlerden biri olan aflatoksin (özellikle aflatoksin B1) P53 tümör baskılayıcı geninde işlev kaybına neden olan bir mutasyona yol açarlar (Goldman & Ausiello 2008; Hsu *et al.* 1991).

Hepatoselüler karsinom tanı ve tedavisi

HCC'nin tanısı zor olmakla beraber tanı süreci, serum belirteçlerine bakmayı, bir ya da daha fazla görüntüleme yönteminin kullanılmasını ve histolojik doğrulamayı gerektirmektedir. Tanı esnasında gerçekleştirilen rutin laboratuvar tetkikleri karaciğer hastalığına ait anormallikleri göstermektedir. Alkalın fosfataz tümör infiltrasyonuna bağlı olarak yükselebilir. Fetal, rejenerasyonda ve malign hepatositlerde üretilen bir α -globülin olan α -fetoprotein (AFP) HCC taramasında sıkça kullanılan bir belirteçtir. AFP seviyesi kısmen tümörün büyüklüğü ile orantılı olmakla birlikte hastaların %60-80'inde yükselmiş olarak bulunur (Bruix *et al.* 2014). Sirotik bir hastanın karaciğerinde bir kitle varsa ve AFP seviyesi 400-500 ng/mL sınırının üzerindeyse HCC tanısı konabilmektedir. Sirozda ise 20 ng/mL sınırının üzerindeki AFP değerleri %39-64 duyarlılık ve %64-91 özgünlükle HCC tanısı koydurmaktadır. AFP düzeyleri inflamasyon zeminindeki rejenerasyon sürecinde de yükselir, bu nedenle aktif hepatitis sırasında testin özgünlüğünü azaltmaktadır. Önerilen diğer tümör belirteçleri des- γ -karboksi protrombin, plazma ürokinaz benzeri plazminojen aktivatörü, CC-L-fukosidazdır. Tanıya yardımcı olan görüntüleme tekniklerine örnek olarak USG, üç fazlı tomografi ve MR verilebilir. Sirozlu bir hastanın karaciğerinde tipik bir kitle varsa ve AFP seviyesi yüksekse iğne biyopsisi

yapılabılır, ancak tümör belirteçleri normalse ve tanı konusunda şüpheler varsa doku incelemesi gerekmektedir (El-Serag *et al.* 2011).

Tedavi sonuçları, tanı anındaki evreye bağlıdır ve erken evre HCC hastaları cerrahi rezeksiyon ya da karaciğer transplantasyonu ile tedavi edilebilirken, çıkarılamayan ya da metastatik hastalar için ortalama sağkalım oranı 6-8 aydır ve bu oran, rezeksiyon yapılamayan hastalarda 2 yıllık sağkalım oranının %5'in altında olduğunu göstermektedir. HCC genel itibarıyla kötü prognoza sahiptir ve tümörün boyutu, karaciğer işlevlerinin ne kadarının korunduğu ve hastaların ekstrahepatik hastalığının varlığı gibi faktörlerden etkilenmektedir (Luo *et al.* 2017).

Tedavi seçenekleri arasında cerrahi rezeksiyon, ortotopik karaciğer transplantasyonu (OKT), hepatik arterin kimyasal embolizasyonu, tümör içine etanol enjeksiyonu ve radyofrekans ablasyon yer almaktadır (Au *et al.* 2015). Cerrahi rezeksiyon ya da transplantasyonu (OKT) HCC için potansiyel küratif tedavi yöntemleridir ve hastalarda sağkalımın uzamasına neden olmaktadır (Chabner *et al.* 2013). HCC tedavisinde sistemik kemoterapi ve radyoterapinin başarısı sınırlıdır ve tek tedavi protokolü ile başarı sağlanamadığı için uzman hekimlerce hastaya uygun tedavi düzenlenmelidir (Goldman & Ausiello 2008).

Cerrahi rezeksiyonun amacı neoplastik kısmı çıkarırken, geride karaciğer yetmezliği oluşturmayacak kadar yeterli karaciğer dokusu bırakmaktır. Karaciğer dışı hastalık, ağır siroz gibi nedenlerden dolayı HCC hastalarının ancak %20'den azı için cerrahi müdahaleler uygundur. Bu müdahalelerin sonucu ise ekibin deneyimine ve hasta seçimine göre değişmektedir (Llovet *et al.* 2004). Ayrıca, tümör diseksiyonu geçiren hastaların çoğu hala yüksek nüks oranlarına sahiptir ve kanserin metastaz yapması bakımından sonuç tatmin edici değildir (Bruix *et al.* 2014).

Karaciğer transplantasyonu küçük tümörleri olan, ekstrahepatik hastalığı olmayan ve karaciğer rezervi az olan hastalara uygulanması gereken bir tedavi yöntemidir. Karaciğer transplantasyonu için uygunluk saptamada belirgin vasküler invazyonu olmayan, tek ve ≤ 5 cm ya da üç adet ≤ 3 cm lezyonu olan hastalardaki yüksek sağkalım göz önüne alınarak oluşturulan "Milan" kriterleri kullanılır (Mazzaferro *et al.* 1996). Karaciğer nakli için en az B olması gerektiğini ön gören Child-Pugh Skoru ve nakil için önceliğin belirlenmesinde protrombin zamanı (saniye) veya INR, total bilirübin ve kreatinin düzeylerinin logaritmik bir hesaplama sistemiyle karaciğer hastalığının belirlendiği MELD Skoru (Model for End-Stage Liver Disease) da karaciğer transplantasyonu için kullanılan diğer skor sistemleridir (Freeman Jr *et al.* 2002). OKT ile ilgili en önemli sorun ise donör organ için bekleme süresinin uzun olmasıdır. Hatta yüksek MELD skoruna rağmen bekleme süreleri bazen bir yıla kadar uzayabilmektedir

ve hasta nakil beklerken transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), radyofrekans ablasyon (Bobadilla *et al.*) ya da parsiyel hepatektomi yöntemleri uygulanabilir. Son yıllarda OKT sonrası HCC hastalarındaki 1 ve 5 yıllık sağkalım oranlarının %77 ve %61,1 olduğu belirtilmiştir (Chabner *et al.* 2013).

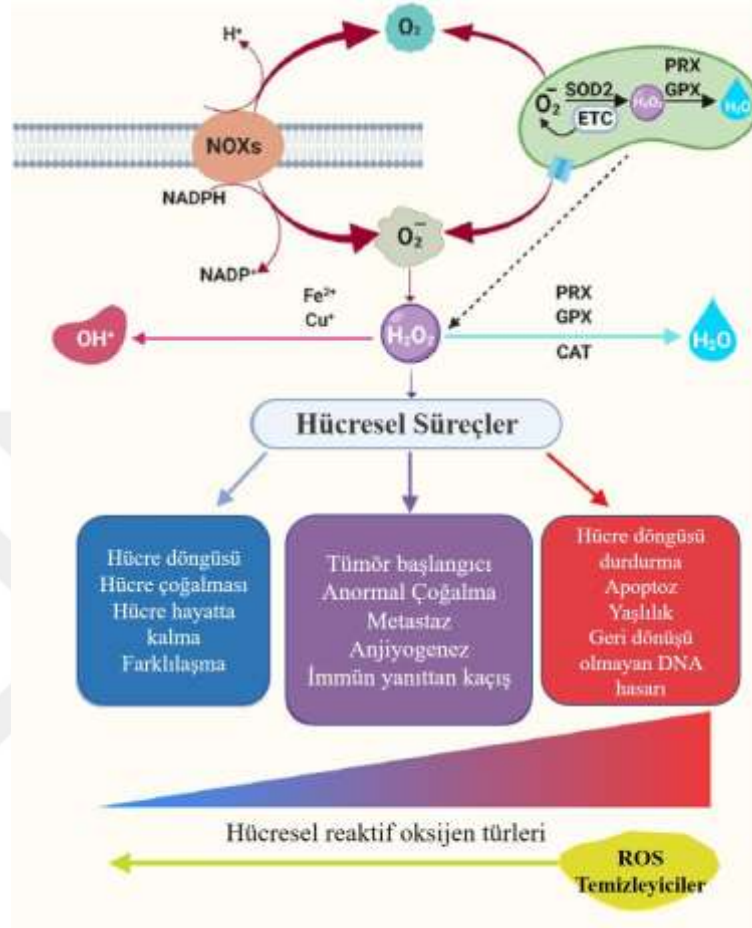
Karaciğere özgü lokal tedaviler arasında en sık kullanılanları TACE ve RFA tedavi yöntemleridir (Bruix *et al.* 2004; Lencioni 2010). Ayrıca perkütan etanol enjeksiyonu (Huang *et al.*) da ayrıca kullanılmaktadır (Ishii *et al.* 1996). HCC'nin en önemli kan sağlayıcısı olan hepatik arterin kan akımını azaltmak ya da bu yolla sitotoksik kemoterapi vermek düşüncesi ile bazı teknikler geliştirilmiştir. İntrahepatik arteriyel kemoterapi ile emboli oluşturan parçacıkların kullanılması ile gerçekleştirilen TACE yöntemi üzerinde çok yoğun bir şekilde çalışılmıştır ve transarteriyel kemoterapide sisplatin ve doksorubisin gibi pek çok kemoterapötik ajan kullanılmıştır (Bruix *et al.* 2004). Küçük HCC'li ancak bozulmuş karaciğer fonksiyonları ya da cerrahi müdahale ihtimalinin az olduğu hastalara lokal ablatif tedaviler kullanılmaktadır ve bunun için genellikle hastalara PEI ya da RFA uygulanmakta olup PEI ve RFA 4 cm'den küçük lezyonlarda daha iyi sonuç vermektedir (Lencioni 2010).

HCC'nin tedavisinde sistemik kemoterapi oldukça etkisiz ve düşük yanıt oranlarına sahiptir. Ayrıca hastalarda sağkalım avantajı göstermemiştir. Bunun nedeninin pek çok değişik etiyoloji ve risk faktörlerine bağlı olarak değişik hepatokarsinogenez göstermesi ile HCC'nin heterojen bir hastalık olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte HCC, kemorezistan bir tümördür ve çoklu ilaç direnci geni olan MDR-1'e sahip olup HCC çoğu kemoterapötik maddelere karşı direnç geliştirmektedir (Wilson *et al.* 2012). Ayrıca, oksaliplatin ve sorafenib gibi HCC'nin başlıca antikanser ilaçlarının yan etkileri vardır ve çoklu ilaç direnci ile ilişkilidir. Pek çok çalışmada da tek ajan ya da kombine kemoterapi rejiminin HCC'de etkili olmadığı gösterilmiş ve araştırılan bu kemoterapötik ajanların yanıt oranları düşük ve kısa süreli olduğu belirtilmiştir. Daha da önemlisi HCC'de kemoterapinin sağkalıma katkısı gösterilememiştir. Ancak kemoterapi amaçlı en çok kullanılan ve sınırlı etki gösteren ajanlar doksorubisin, 5FU, interferon ve sisplatinle birlikte doksorubisin olmuştur (Chabner *et al.* 2013).

Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROS), başta oksijen metabolizması olmak üzere çeşitli hücresel metabolik reaksiyonların yan ürünleri olarak üretilen ve moleküler oksijenin (O₂) kısmi olarak indirgenmesiyle oluşan, sürekli hücrelerde üretilip hücrelerden çıkarılan, kısa ömürlü eşleşmemiş elektronlar içeren, yüksek derecede reaktif iyon ve moleküller olarak tanımlanır (Galadari *et al.* 2017; Zorov *et al.* 2014). Normal sağlıklı hücrelerde düşük konsantrasyonda

bulunan ROS, hücresel sinyal verme ve farklılaşmanın düzenlenmesinden hücresel hasar ve ölümün desteklenmesine kadar çeşitli hücre homeostazında önemli rol oynayan hem serbest radikalleri hem de radikal olmayan oksijen türevlerini içerir (Şekil 5) (Choudhari *et al.* 2014; Harris & DeNicola 2020).



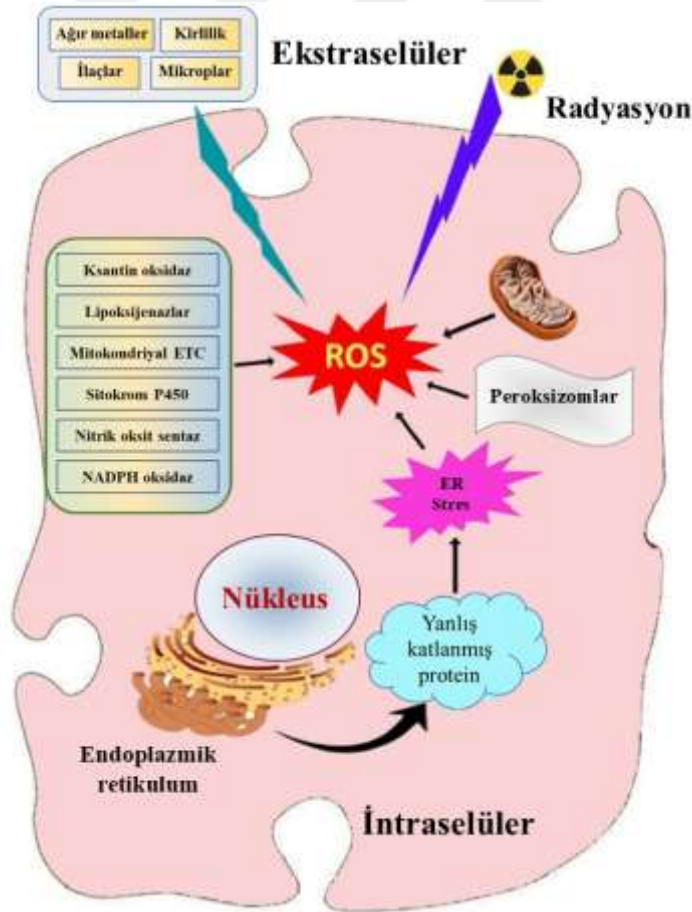
Şekil 5. Hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinin hücresel fonksiyonlarda etkisi (Modifiye edilmiştir.) (Kirtonia *et al.* 2020)

Fagositik hücreler, özellikle makrofajlar, Kupffer hücreleri, polimorfonükleer nötrofiller (PMN'ler), endotel hücreleri ve enterositler, hepatositler, alveolar epitel hücreleri ve renal tübüler epitel hücreleri dahil olmak üzere çeşitli epitel hücreleri başta olmak üzere pek çok hücre türünde endojen ve ekzojen kaynaklar tarafından ROS'un üretimi tetiklenebilir (Fink & Care 2002).

Mitokondri, ATP üretimi sırasında mitokondriyal elektron taşıma zinciri (Hsu *et al.*) tarafından yüksek düzeyde ROS üretiminin desteklemesiyle çoğu hücrelerde ROS'un ana endojen kaynağı olmakla birlikte diğer önemli endojen kaynaklar arasında sitokrom P450 kompleksinden detoksifiye edici enzimler, lipoksijenazlar (LOX), ksantin oksidaz (Stockwell *et al.*) ve NOX ailesini içeren nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz kompleksleri yer almaktadır (Şekil 6) (Galadari *et al.* 2017; Sosa *et al.* 2013). Diğer ana

kaynakların aksine ROS'u bir yan ürün olarak üretmek yerine ana işlev olarak üreten NOX kompleksleri, hücre zarları, mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumda NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 ve DUOX2 dahil olmak üzere 7 farklı izoform halinde bulunur ve bu ayrı 7 izoform ROS'un farklı türlerini farklı alanlarda spesifik olarak üretir (S Hernandez & RG Britto 2012). Örneğin NOX 1-3 ve 5 izoformları tarafından tehlikeli süperoksit radikalleri üretilirken NOX4 ve DUOX1-2 tarafından doğrudan hidrojen peroksit üretilir (Ramalingam & Rajaram 2020).

ROS'un üretimini tetikleyen ekzojen kaynaklar arasında ise UV radyasyonu, kimyasal bileşikler (genotoksik olmayan kanserojenler, çeşitli ksenobiyotikler, ilaçlar, çevresel kirlenmeler, sigara ve alkol vb.), ağır metaller gibi faktörler yer almaktadır (Şekil 6) (Choudhari *et al.* 2014; Sosa *et al.* 2013). Örneğin iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile hücrelerde, su ile etkileşim yoluyla ROS üretilir. Etkileşim üzerine su bir elektron kaybeder ve sırayla bir hidroksil radikaline ($\bullet\text{OH}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), bir süperoksit radikaline ($\text{O}_2\bullet^-$) ve en sonunda oksijene (O_2) dönüştürülür (Poljšak *et al.* 2012).



Şekil 6. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) endojen ve eksojen kaynakları (Modifiye edilmiştir.) (Ramalingam & Rajaram 2020)

Oksidatif metabolizmadan türetilen tüm bileşikler arasında en bol üretilen ROS olup bu bileşikler, reaktif nitrojen türleri (RNS), reaktif sülfür türleri (Gauslaa *et al.*) ve reaktif klorür türleri (RCS) olmak üzere kimyasal yapısına dahil olan ana atoma göre reaktif türler içerisinde dört ana gruba ayrılmaktadır (Sosa *et al.* 2013). ROS'lar ise, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil ($\bullet OH$), peroksil ($RO_2^{\bullet}$) ve alkoksil ($RO^{\bullet}$) gibi serbest oksijen radikallerini ve oksitleyici ajanlar olan veya kolayca radikallere dönüştürülen hipokloröz asit ($HOCl$), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1O_2$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi belirli radikal olmayanları içermektedir (Prasad *et al.* 2017). Tek sayıda elektron içermesiyle onları daha kararsız ve kısa ömürlü kılan serbest radikallerdeki eşleşmemiş olan elektronun varlığı, bu bileşiklerin yüksek reaktiviteye sahip olmasını sağlar. Bunun sonucu olarak bu bileşikler, genellikle en yakın kararlı molekülle reaksiyona girerek kararlılık kazanmak için elektronunu çalar ve saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybetmesi ile kendisi bir serbest radikal haline gelir (Choudhari *et al.* 2014). ROS'lardan sonra en sık karşımıza çıkan RNS'ler arasında ise en bol bulunan türler, süperoksit anyonu ve nitrik oksit arasındaki etkileşimle üretilen peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) ve belirli ROS ile reaksiyona girebilen nitrik oksit (NO). Nitrik oksit de daha sonra peroksinitröz aside ve nihayetinde bir hidroksil radikale ve nitrit anyonuna (NO_2^-) dönüştürülmektedir (Sosa *et al.* 2013).

Süperoksit

Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) orta derecede reaktif olup kısa ömürlüdür ve süperoksit dismutaz (SOD) ile veya enzimatik olmayan yollarla kolayca hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşebilen ve ayrıca diğer reaktif türlere de çeşitli yollarla dönüştürülebilen başlıca ilk serbest radikal türüdür. Anyonik yüke sahip olması membranlardan difüzyonunu engellemiş olup belirli kanallar yoluyla sınırlı difüzyon kapasitesine sahiptir (Harris & DeNicola 2020).

Başta normal hücresel solunum olmak üzere araşidonik asidin lipoksijenazlar ve siklooksijenazlar tarafından metabolizmasından ve enflamatuar ve endotelial hücrelerden çok sayıda farklı yolla $O_2^{\bullet-}$ oluşturulur (Al-Gubory *et al.* 2012). Süperoksit, oksidatif fosforilasyon sırasında iç mitokondriyal membrandaki elektron taşıma zincirinin (Hsu *et al.*) elemanlarından olan kompleks I (NADH dehidrojenaz) ve III (ubisemikinin) tarafından elektron taşınmasının bir yan ürünü olarak moleküler O_2 'den tek bir elektronun indirgenmesiyle oluşturulur. Bu süperoksit molekülleri kompleks I tarafından matrise bırakılırken, kompleks III tarafından hem matrise hem de mitokondride zarlar arası boşluğa salınmaktadır (Şekil 7) (Gill *et al.* 2010). Süperoksit hücre içi olarak ETC tarafından üretilirken hücre dışı olarak mikroplar veya lipopolisakkarit veya çeşitli proinflamatuar araçlar gibi mikrobiyal ürünler tarafından fagositlerin aktivasyonundan sonra oluşan yedi üyeli NOX enzim ailesinin NOX1-3 ve 5

enzimleri ile belirli hücre tipleri (örneğin nötrofiller) tarafından üretilir (Patlevič *et al.* 2016). Ayrıca ürik asidi oluşturan enzim olan XO, NOX'un aksine reaksiyon yan ürünü olarak hem süperoksidi hem de hidrojen peroksiti peroksizomlarda üretmektedir. Bir başka süperoksit üretimi ise oksidatif protein katlanmasının bir sonucu olarak endoplazmik retikulumda gerçekleşir (Galadari *et al.* 2017).

Peroksinitrit

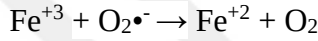
Reaktif nitrojen türleri (RNS), antioksidasyona veya redüksiyona kıyasla aşırı oksidasyona veya nitrosilasyona neden olan çeşitli oksijen-nitrojen türlerini içermekle birlikte önemli bir biyolojik sinyal molekülü olan nitrik oksit (NO), O₂ veya O₂^{•-} ile etkileşimlerinden oluşur. Bu etkileşimler sonucu oluşan ve en çok göze çarpan RNS'ler dinitrojen trioksit (N₂O₃) ve peroksinitrit (ONOO⁻)'tir (Şekil 7) (Choudhari *et al.* 2014). Bu türevlerin oluşumunu sürekli destekleyen bir durum ise çok kısa bir yarı ömre sahip olan NO'nun zarlar boyunca ve hücreler arasında kolayca hareket edebilmesidir ve bu durumda peroksinitrit gibi RNS moleküllerini oluşturmak için aynı hücrede NO ve O₂ üretilmesine gerek yoktur (Pacher *et al.* 2007). Üretilen bu RNS'lerin başında gelen radikal olmayan bir tür olan ONOO⁻ ise proteinlerle reaksiyona girerek amino asitlerin oksidasyonuna veya nitrasyonuna, DNA'da çift sarmallı kırılmalara ve lipidlerin lipid peroksidasyonuna neden olarak oksidatif stres durumuna katkıda bulunur (Gersch *et al.* 2009).

Hidrojen peroksit

Uzun ömürlü olan hidrojen peroksit (H₂O₂), orta derecede reaktif olup proteinler ve DNA ile reaksiyona girmek için membranlardan kolaylıkla geçebilme yeteneği ile üretildiği yerden uzak yerlerde de etkisini sürdürmekte ve bu durum onu hücre içi sinyalizasyon için ideal bir aday yapmaktadır. Protein oksidasyonundan sorumlu birincil ROS olan H₂O₂, düşük seviyelerde (1-10 nM), oksidasyon yoluyla, redoks sinyalleme yoluyla sinyal verme konusunda önemli bir rol oynarken, daha yüksek seviyelerde (>100 nM) oksidatif strese neden olmaktadır (Sies 2017). Süperoksit dismutaz enzimleri (SOD1 ve SOD2) tarafından O₂^{•-}, H₂O₂'ye dönüştürülür. Ayrıca H₂O₂ endoplazmik retikulumda (ER) oksidatif protein katlanmasının bir sonucu olarak Ero1 tarafından ve NOX enzim ailesinin üyelerinden olan NOX4, DUOX1 ve DUOX2 tarafından doğrudan üretilir. Üretilen H₂O₂, katalaz (Cat), glutatyon peroksidaz (GPx) ve peroksiredoksinleri (PRDX) kapsayan hücresel peroksidazlar ile indirgenerek suya detoksifiye edilir (Şekil 7) (Galadari *et al.* 2017; Harris & DeNicola 2020).

Hidroksil radikali

Hücre metabolizmasında O₂'nin art arda monovalent indirgenmesiyle oluşan hidroksil radikali (•OH), çok kısa ömürlü bir serbest radikaldir. Tüm ROS içinde en reaktif olan •OH, DNA, proteinler, lipidler ve hemen hemen her hücre bileşeni ile potansiyel olarak reaksiyona girerek onlara zarar verebilir. Ayrıca bu yüksek derecede reaktif olan ROS'un ortadan kaldırılması için herhangi bir enzimatik mekanizmanın olmaması sonucunda aşırı •OH üretimi, hücre ölümüne neden olabilir (Paiva *et al.* 2014). •OH, H₂O₂'den oluşur ve bu oluşum H₂O₂'nin demir (Fe⁺²) ile reaksiyona girdiği fenton reaksiyonunda meydana gelir. O₂•⁻ de ayrıca ferrik (Fe⁺³)'i, Fe⁺²'ye indirgeyerek •OH oluşumuna katkıda bulunur (Şekil 7). H₂O₂'nin ve demir iyonlarının varlığında gerçekleşen bu sentez, Haber – Weiss reaksiyonu olarak bilinen biyolojik sistemlerde olmaktadır (Winterbourn 1995). İlk adım, ferriğin demir iyonuna indirgenmesini içermektedir:

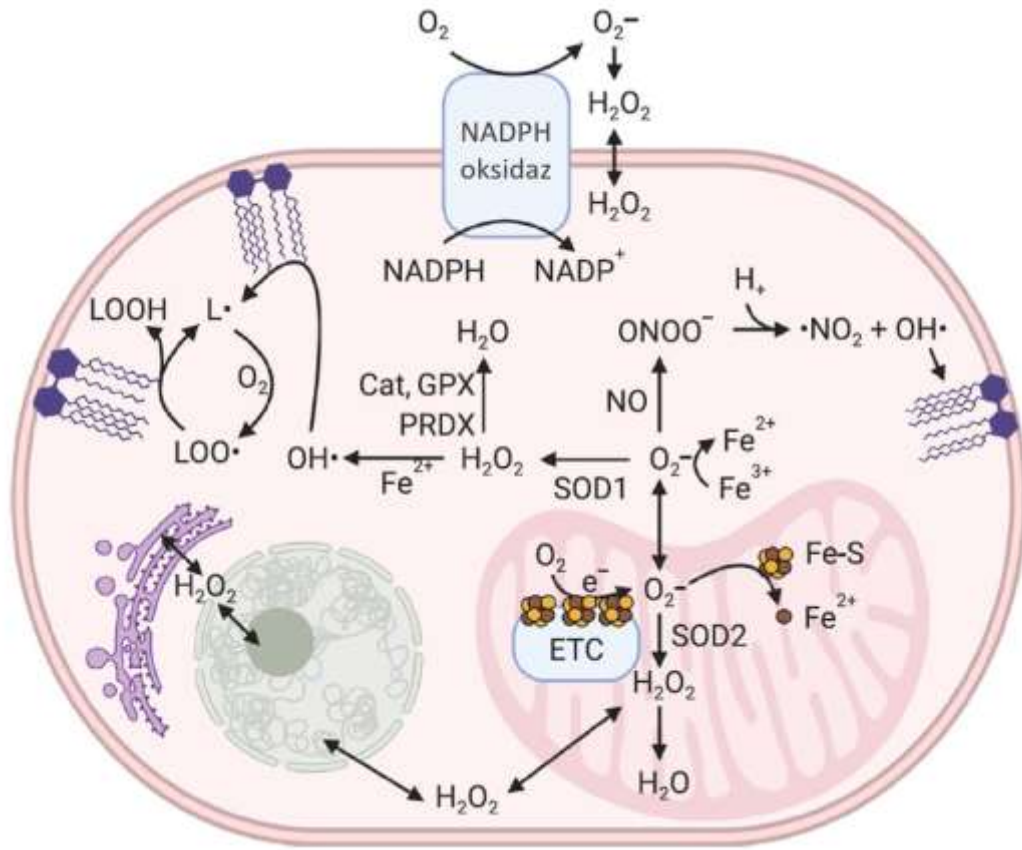


İkinci adımda ise fenton reaksiyonu gerçekleşir:



Lipid peroksitler

Karbon-karbon çift bağları nedeniyle, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), hücrelerdeki çift katlı lipid tabakasının bütünlüğünü tehlikeye atan ve •OH tarafından başlatılan lipid peroksidasyonuna oldukça duyarlı olan reaktif hidrojen atomları içermektedir. Lipid peroksidasyonu denilen biyolojik süreçte, lipid peroksitler oluşturmak için bir yayılma reaksiyonunda PUFA'lar ile reaksiyona giren lipid radikallerinin ve lipid peroksil radikallerinin oluşumuna yol açmaktadır. Bu lipid peroksidasyon kaskeyd sürecini açacak olursak ilk •OH, lipid peroksit radikalleri (LOO•) oluşturmak için oksijen ile reaksiyona giren lipid radikallerini (L•) meydana getirmek için lipidlerle reaksiyona girer. LOO•, L• ve lipid peroksitleri (LOOH) yeniden oluşturmak için lipidlerle reaksiyona girer ve döngü devam eder (Şekil 7). Aşırı lipid peroksidasyonu gerçekleşmesi halinde ise ferroptoz olarak bilinen demire bağlı hücre ölümü meydana gelmektedir (Stockwell *et al.* 2017).

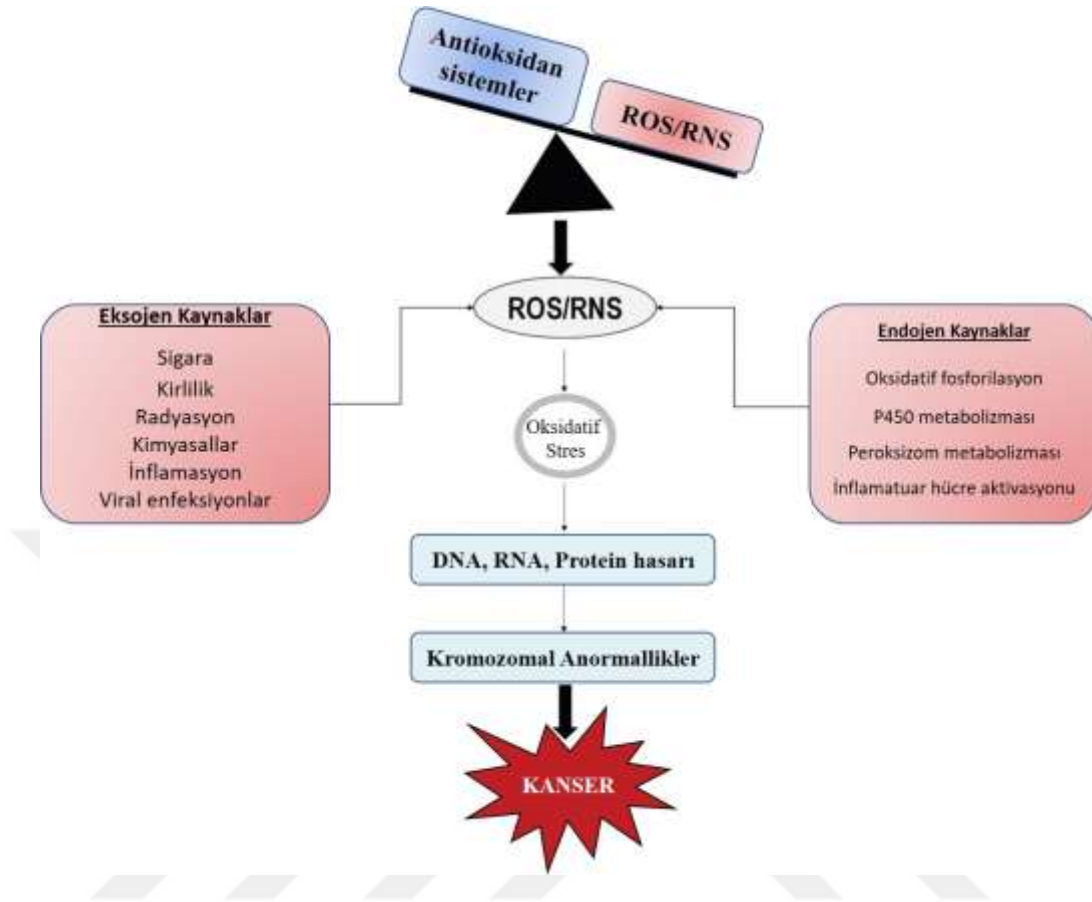


Şekil 7. Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) (Harris & DeNicola 2020)

Oksidatif stres

Hücrelerde çeşitli biyokimyasal yollarla ve fizyolojik oksidatif süreçlerle üretilen ROS, ilk kez ortaya atıldığında, hücreler için çok toksik olduğu ve yalnızca patolojik durumlarla ilişkili olduğu düşünülse de sonradan yapılan araştırmalarla ROS'un pek çok sayıda çeşitli hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (D'Autréaux & Toledano 2007; Weidinger & Kozlov 2015). Karmaşık ve paradoksal biyolojik rolleri üstlenen ROS, düşük konsantrasyonlarda iken hücre içi sinyalleme ve homeostazın düzenlenmesi için protein fosforilasyonu, transkripsiyon faktörü aktivasyonu, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz, hücre bağışıklığı ve kardiyak ve vasküler hücre işlevlerinin düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde kontrolü sağlama ve ikincil haberci olarak işlev görmektedir. Ancak ROS hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunuyorsa protein, lipid ve DNA gibi hedef hücrel bileşenler üzerinde hasara neden olarak hücrel proliferasyon, hayatta kalma, yaşlanma, tümör başlangıcı, genomik instabilite, bağışıklık kaçışı, metastaz, invazyon ve anjiyogenez gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları modüle ederek kanser, hiperlipidemi, diabetes mellitus, metabolik bozukluklar, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar (hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı, kronik kalp yetmezliği) ve nörodejeneratif hastalıklar gibi bir dizi insan hastalığının

gelişiminden ve ilerlemesinden sorumlu olan oksidatif stres durumunu tetikler (Şekil 8) (Kirtonia *et al.* 2020; Patlevič *et al.* 2016).



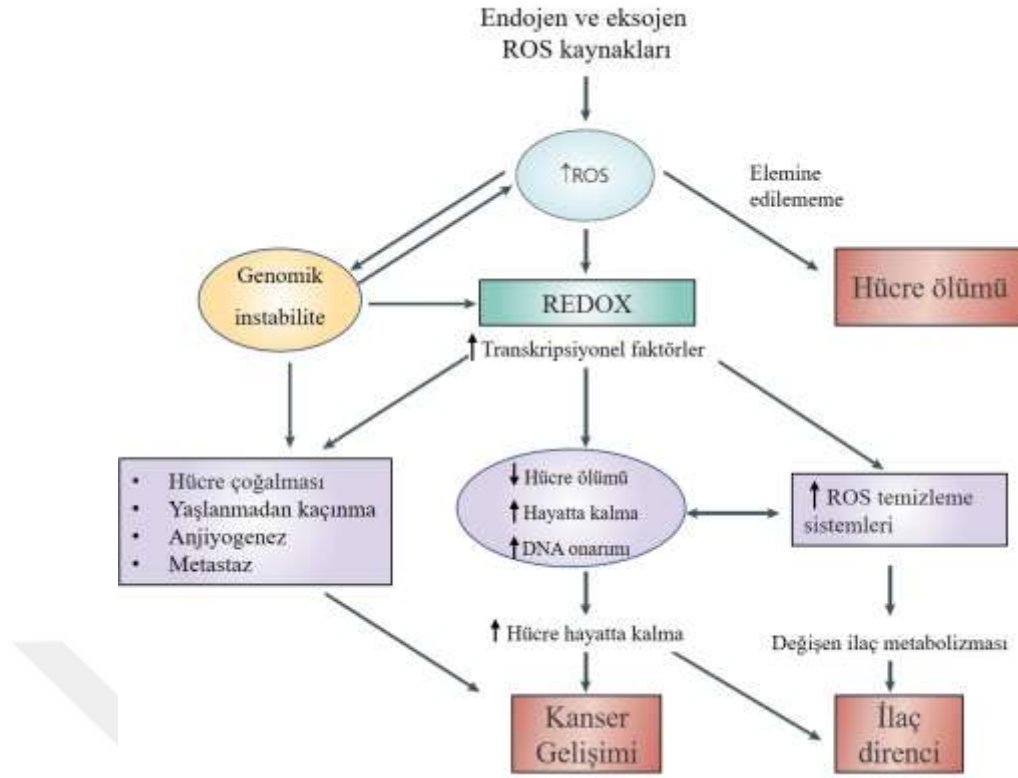
Şekil 8. Artan ROS/RNS'nin kaynakları ve oluşan oksidatif stres durumu (Silva *et al.* 2018)

İlk Sies tarafından, oksidanlar ve antioksidanlar arasında oksidanlar lehine, potansiyel olarak hasara yol açan bir dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres durumu, sadece hücrelerdeki ROS konsantrasyonlarına bağlı değil aynı zamanda ROS ve ROS üretimi ve nötralizasyonu arasındaki dengeyi koruyan antioksidan savunma sistemlerinin arasındaki dengeye de bağlıdır (Sies 1986; Sosa *et al.* 2013). Bu denge bozulduğunda, DNA, RNA, lipidler ve proteinler zarar görürler ve bunun sonucunda DNA'da çentikler, DNA onarım mekanizmasında arızalar ve 8-hidroksi-2-deoksiganosin üretimi ile DNA'da mutasyonlar; lipid peroksidasyon reaksiyonları sonucunda hücre zarındaki çoklu doymamış lipidlerin hasar görmesine sebep olarak hücre zarının geçirgenliğini artırması yoluyla hücre ölümleri; sülfür reaktif radikallere dönüştürülebilen protein karbonil gruplarının (yani, aldehitler ve ketonlar) ve tiyol gruplarının (-SH) oluşumu ve birikmesi ile proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ve kayıplar ortaya çıkmaktadır (Halliwell & Chirico 1993; Levine & Medicine 2002; Matsui *et al.* 2000; Veskoukis *et al.* 2012).

Reaktif oksijen türlerinin kanser üzerindeki etkisi

Kanser hücrelerinin normal sağlıklı hücrelere kıyasla, hücrede artmış reseptör aktivitesinin, onkojenik aktivitenin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin varlığının artmasının bir sonucu olarak artmış bir metabolizmadan veya mitokondriyal disfonksiyondan, NADPH oksidazlar (NOX), siklooksijenazlar, lipooksijenazlar, ksantin oksidazlar (Stockwell *et al.*) ve sitokrom P450 enzimlerinden intraselüler oksidan üretiminden dolayı daha yüksek ROS seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Moloney & Cotter 2018).

Kanserde artan ROS'un hücresel süreçler üzerindeki etkileri karmaşıktır ve pro- ve anti-tümörjenik gibi çeşitli rolleri üstlenmektedir. Örneğin hücrelerde pro-tümörjenik sinyali aktive ederek tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı oluşturabilir, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu artırabilir ve DNA hasarını ve genetik instabiliteyi tetikleyebilir veya tam tersi olarak yüksek seviyelerdeki ROS, tümör hücresi ölümünü başlatan oksidatif stresin neden olduğu anti-tümörjenik sinyalleme gerçeğine de neden olabilir (Levine & Puzio-Kuter 2010; Sabharwal & Schumacker 2014; Vander Heiden *et al.* 2009). Yüksek ROS seviyelerinin melanom, hepatom, lösemi, glioma ve meme, pankreas, mesane, kolon, akciğer ve prostat kanserleri dahil olmak üzere pek çok kanser türünün gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynadığı da kanıtlanmıştır (Prasad *et al.* 2017). Ayrıca ROS'un kanserde sinyal molekülleri olarak hareket ederek metastaza, apoptoza direnç göstermeye, anjiyogeneze, bazı kanser türlerinde farklılaşmaya ve kemoterapiye karşı direnç geliştirmesinde katkıda bulunduğu da gösterilmiştir (Şekil 9). Bu zıt ve karmaşık etkiler ele alındığında ROS'u ortadan kaldırarak veya ROS üretimini artırarak çeşitli tedavi yöntemleri araştırılmış ve bu amaç doğrultusunda kullanılan tedavilerin oldukça zor olmasına rağmen, potansiyel olarak etkili kanser tedavi imkanları sunduğu kabul görmüştür (Moloney & Cotter 2018).



Şekil 9. Reaktif oksijen türlerinin kanser gelişimine katkısı (Modifiye edilmiştir.) (Trachootham *et al.* 2009)

Bir başka kanser tedavi yaklaşımı ise ROS ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge üzerine kurulmuştur. Hücrelerdeki çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile tetiklenen, antioksidan sistem enzimlerinin ekspresyonundaki ve aktivitesindeki artış, kanser hücrelerinde artan ROS seviyesini dengelenmekte ve böylece kanser hücrelerinin ölümden kaçmasına izin vermektedir. Bu yaygın etki sonucunda bilim insanları, farklı hücre ölüm yollarının aktivasyonuna yol açacak ROS oluşumunu artıran ve antioksidan sistemlerin aktivitesini azaltan terapötik stratejiler üzerinde çalışmıştır. Hatta birçok antikanser ajanların ROS oluşumunu modüle ederek kanser hücrelerinin ilaç direncini yıkarak kemoterapötik ajanlara karşı onları duyarlı hale getirdiği ve onları ortadan kaldırdığı saptanmıştır (Galadari *et al.* 2017).

Antioksidan Savunma Sistemleri

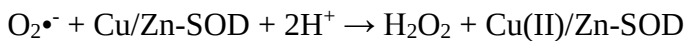
Normal hücresel işleyiş sırasında üretilen ROS'ların zararlı ve istenmeyen sonuçlarını önlemek için ROS üretimi ile eliminasyonu arasındaki dengenin korunması gerekir (Trachootham *et al.* 2009). Bu yüzden hücreler, ROS'un ortadan kaldırılmasına katılan bir enzimi veya kofaktörü ifade eden antioksidan savunma sistemleri tarafından sıkı bir şekilde korunarak hücresel homeostaz sağlanmış olur (Harris & DeNicola 2020).

Hücrede bu rolü üstlenen süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), peroksiredoksin (PRX) ve tiyoredoksin (Trx) sistemleri enzimatik antioksidan savunma sistemleri arasında yer alırken endojen ve eksojen kaynaklı; glutatyon, flavonoidler, alfa-lipoik asit, koenzim Q, ferritin, ürik asit, bilirubin, L-karnitin, melatonin Askorbik asit (Vitamin C), tokoferol (Vitamin E), β -karoten (Vitamin A), polifenol metabolitler enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri arasında yer alır (Moloney & Cotter 2018; Yoshida *et al.* 2003).

Süperoksit temizleme mekanizması

Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikallerini temizleyen birincil antioksidan enzimleri arasında süperoksit dismutaz (SOD) yer almaktadır. SOD'lar, çeşitli hücrel bölmelerde bulunan, katalitik olarak $O_2^{\bullet-}$ anyonlarını oksijene (O_2) ve H_2O_2 'ye dönüştürmek için işlev gören bir metal kofaktöre sahip metaloenzimlerdir. Barındırdıkları metal kofaktörlerine göre üç ayrı SOD enzimleri ökaryotik hücrelerde şöyle konumlanmıştır: demir SOD (Fe-SOD) kloroplastlarda, manganez SOD (Mn-SOD veya SOD2) başta mitokondride olmak üzere peroksisomlarda, en bol SOD olan bakır-çinko SOD (Cu/Zn-SOD veya EC-SOD) genellikle sitozol (SOD1) ve hücre dışı (SOD3) boşlukta bulunmaktadır (Abreu *et al.* 2010).

Ökaryotik hücrelerde, hücre içi $O_2^{\bullet-}$ seviyesi, Cu / Zn-SOD ve Mn-SOD olmak üzere iki temel enzim tarafından düzenlenir. Bu enzimler, $O_2^{\bullet-}$ 'nin O_2 ve H_2O_2 'ye ayrışmasını katalize eder. Cu / Zn-SOD'un katalizlediği enzimatik mekanizma aşağıda gösterildiği üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. Birinci reaksiyonda, enzimin oksitlenmiş Cu (II) formu $O_2^{\bullet-}$ tarafından indirgenir ve dioksijen salınır. İkinci reaksiyonda ise indirgenmiş Cu başka bir $O_2^{\bullet-}$ anyonu ve iki proton (H^+) tarafından oksitlenerek H_2O_2 oluşturur (Abreu *et al.* 2010).



Ökaryotik hücrelerdeki Mn-SOD ise, esas olarak mitokondride ifade edilir ve aktif bölgelerinde manganez yer almaktadır ve $O_2^{\bullet-}$ temizleme mekanizması, oksitlenmiş (Mn^{+3}) ve indirgenmiş (Mn^{+2}) iyonlar arasında geçiş yapmasına dayanmaktadır (Abreu *et al.* 2010).

Peroksinitrit temizleme mekanizması

Fazla NO veya $O_2^{\bullet-}$ ile peroksinitrit aracılı oksidasyon reaksiyonlarının inhibisyonu, ONOO⁻'nin ayrışmasından oluşan $\bullet OH$ ve nitrojen dioksitin ($\bullet NO_2$) temizlenmesi yoluyla gerçekleşir (Jourdeuil *et al.* 2001). ONOO⁻'den peroksinitröz aside (ONOOH) protonasyon meydana geldiğinde ONOO⁻ anyonu fizyolojik pH'ta hızlı bir şekilde ayrışarak nitrat (NO_3^-),

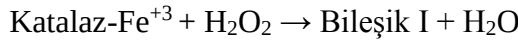
•OH ve •NO₂ oluşturur. Oluşan bu •OH ve •NO₂ ile NADH reaksiyona girerken, nötr bir pH'ta glutatyon (GSH) ile ONOO⁻ doğrudan reaksiyona girer (Goldstein & Czapski 2000).

Ayrıca peroksiredoksin (PRDX) ve tiyoredoksin (Trx) sistemleri, sistein kullanarak ONOO⁻'in suya indirgenmesini kolaylaştırır (Moloney & Cotter 2018). Özellikle PRX üyelerinden biri olan PRX5, bir ONOO⁻ tutucu olarak daha etkili bir şekilde davranmaktadır (Sosa *et al.* 2013).

Hidrojen peroksit temizleme mekanizması

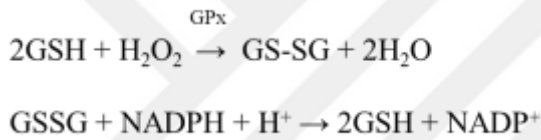
O₂•⁻ 'nin dismutasyonu sonucu üretilen H₂O₂, gerekli hücresel sinyalleme için seviyelerini korumak üzere katalaz (Cat), glutatyon peroksidaz (GPx), peroksiredoksinler (PRDX) ve tiyoredoksin (Trx) antioksidan sistemleri tarafından H₂O'ya indirgenir (Moloney & Cotter 2018).

Cat, hücre içi H₂O₂'nin ayrışmasında görev alan, aktif bölgelerine bağlı ferrik (Fe⁺³) hem grupları içeren tetramerik bir enzimdir (Aksoy *et al.* 2005). Ökaryotik hücrelerde, peroksizomlarda lokalize olan Cat, iki aşamalı bir reaksiyon ile H₂O₂'i H₂O ve O₂'ye dönüştürür. Aşağıda belirtildiği üzere ilk aşamada, hem grubundaki Fe⁺³, H₂O₂'yi H₂O'ya indirger ve Bileşik I olarak adlandırılan bir yapı oluşturur; ikinci aşamada ise, Bileşik I ikinci bir H₂O₂ molekülünü O₂'ye oksitler ve oksijen türlerini H₂O olarak serbest bırakır. Cat enzimleri H₂O₂'lerin temizleme işlemini tekrar serbest radikal üretmeden yapmaktadır (Patlevič *et al.* 2016).

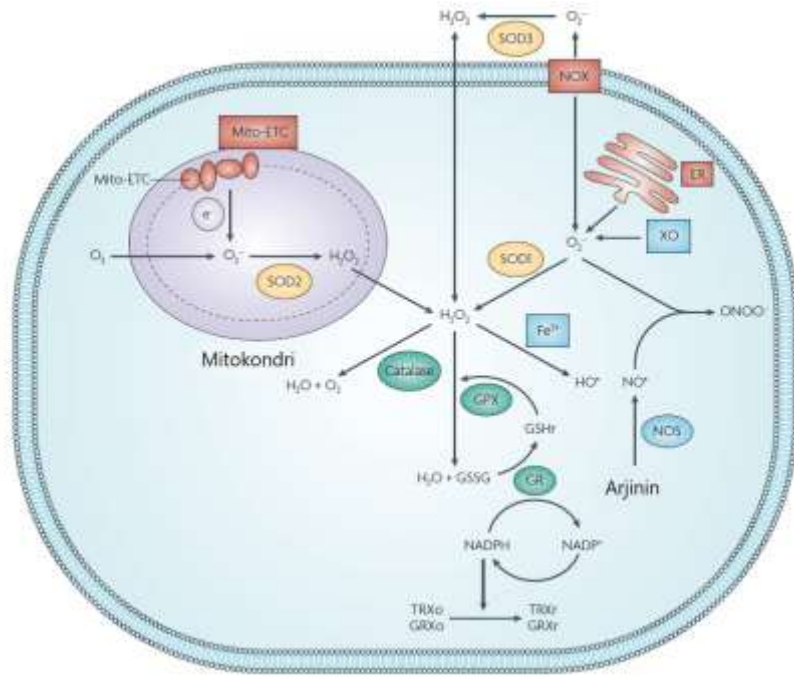


Peroksizomal enzimler tarafından sentezlenen H₂O₂ çoğunlukla Cat enzimi tarafından elimine edilirken, mitokondriden veya sitozolik Cu/Zn-SOD enziminin etkisiyle ortaya çıkan H₂O₂ GPx tarafından elimine edilir (Deponte 2013). Glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferazların (GST) yer aldığı glutatyon antioksidan savunma sisteminin bir diğer üyesi olan bu GPx tarafından lipid ve hidrojen peroksitler indirgenir. GPx'in; kırmızı kan hücreleri dahil çoğu hücrenin sitozolünde bulunan GPx1, gastrointestinal sistemle sınırlı olan sitosolik GPx2, plazmada bir glikoprotein olarak bulunan GPx3 ve serbest radikaller tarafından hasar gören kolesterol ve lipoproteinler gibi kompleks lipidlerle etkileşime girdiği mitokondride bulunan GPx4 olmak üzere dört alt türü vardır. GPx, her biri bir selenyum atomu içeren dört protein alt biriminden oluşan selenoproteindir. Bu enzim indirgeyici substrat olarak GSH'ı kullanarak H₂O₂'nin indirgenmesini katalize etmektedir (Arthur & CMLS 2001).

Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerinden biri de olan GSH glutamin, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan bir tripeptittir ve hücrelerde ya oksitlenmiş (GSSG) ya da indirgenmiş (GSH) durumda bulunabilir (Townsend *et al.* 2003). GSH durumunda iken elektron vericisi olarak bir dizi enzim için kofaktör olmak, S-glutatyonylasyon yoluyla çeşitli protein fonksiyonlarını modüle etmek ve sistein için bir taşıyıcı / depolama formu olarak hizmet etmek gibi önemli birçok role sahiptir (Deponte 2013; Dickinson & Forman 2002). Ayrıca H_2O_2 , $^1O_2$, $\bullet OH$ ve $O_2\bullet^-$ 'yi temizleme görevini üstlenir ve farklı biyomolekülleri, doğrudan reaktif elektrofillerle (glutatyonylasyon) katkı maddeleri oluşturarak veya bunları ROS veya organik serbest radikallerin varlığında indirgeyerek bağlar. Bunun sonucunda ise oksitlenmiş form olan glutatyon disülfidi (GSSG) bir yan ürün olarak ortama verir (García-Caparrós *et al.* 2020). Ancak normal fizyolojik koşullarda GSH'ın hücresel konsantrasyonu yüksek, GSSG'nin düşük seviyelerde tutulması gerekir. Bu yüzden glutatyon antioksidan savunma sistemlerinin bir üyesi olan glutatyon redüktaz (GR) tarafından NADPH'ye bağlı mekanizma ile GSSG'yi indirgeyerek GSH havuzunu doldurur (Jozefczak *et al.* 2012).



ROS / H_2O_2 için ideal temizleyicilerden biri olan PRDX ise endoplazmik retikulum, sitozol, peroksizom ve mitokondride lokalize olmak üzere altı farklı tipi mevcuttur ve H_2O_2 ile oksidasyona duyarlı yüksek oranda korunmuş sistein kalıntıları içerirler (Rhee *et al.* 2012). PRDX'ler, bu sistein kalıntılarının oksidasyonu yoluyla H_2O_2 'yi nötralize eder (Wood *et al.* 2003). Özellikle bu altı tipten biri olan PRDX3, H_2O_2 'nin %90'ına kadar temizlemektedir. Bu oksitlenmiş PRDX'ler ise daha sonra TRX yoluyla indirgenir, bunun sonucunda TRX oksitlenir ve ardından tiyoredoksin redüktaz (TRXR) tarafından indirgenir (Şekil 10) (Rhee *et al.* 2012).



Şekil 10. Enzimatik antioksidan savunma sistemleri tarafından hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi (Trachootham *et al.* 2009)

Bazı enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerinin reaktif oksijen türlerini temizleme mekanizmaları

Flavonoidlerin, H_2O_2 ve H_2O_2 tarafından üretilen $\bullet OH$ temizleme yetenekleri mevcuttur. Ayrıca $^1O_2$ 'i de temizleyebilirler (Ozyigit *et al.* 2016; Schulz *et al.* 2016).

Askorbik asit de denilen C vitamini sulu ortamlarda serbest radikalleri parçalayarak ROS'un detoksifikasyonuna katılan, suda en bol çözünen antioksidandır (Seminario *et al.* 2017). Doğrudan $O_2\bullet^-$, $\bullet OH$ ve $^1O_2$ 'i temizler ve H_2O_2 'yi H_2O 'ya indirgeyebilir (Liang *et al.* 2017).

Tokoferol denilen E vitamini, lipid peroksitleri üzerinde etkili olan bir antioksidan türüdür. Ayrıca $^1O_2$ 'nin fiziksel ve kimyasal olarak temizlenmesinde ve uzaklaştırılmasında da görev alır (García-Caparrós *et al.* 2020).

A vitamininin etken maddesi olan karotenoidler oksidatif hasarı önlemek için $^1O_2$ 'nin atılmasında görev almaktadır (Liang *et al.* 2018).

Antioksidan savunma sistemlerinin kanserle ilişkisi

Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelere kıyasla kanserin başlaması ve ilerlemesinde rol oynaması üzerine yüksek seviyelerde ROS üretir. Ancak kanser hücrelerinin, ölümlerini önlemek için artan bu ROS seviyesini sıkı bir şekilde düzenlemesi gerekir. Bu yüzden kanser hücrelerinde, aşırı miktarda ROS üretimine karşın onları detoksifiye etmek için antioksidan seviyeleri artmakta ve temizleyici enzimler yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir. Böylece,

kanser hücrelerinin antioksidan kapasiteleri, pro-tümörjenik ROS düzeylerini koruyarak hastalığın ilerlemesine ve apoptoza direnç geliştirmesine izin verirken aşırı ROS'u temizler (Gorrini *et al.* 2013).

Pek çok çalışma sonucunda kanser hücrelerinde antioksidan savunma sistemlerine ait enzimlerin ekspresyonunun ve aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Örneğin, mide, yemek borusu, kolorektal adenomlar ve karsinomlar dahil olmak üzere birçok kanser türünde SOD aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Janssen *et al.* 1999; Miranda *et al.* 2000).

Kanser hücrelerinde glutatyon antioksidan sistemindeki değişimlere bakıldığında bazı kanser türlerinde mitokondriyal GSH'nın ROS ile reaksiyona girdiği ve hücrelerin apoptozdan kaçtığı gözlemlenmiş ve hücrelerdeki GSH düzensizliğinin çoklu ilaç ve radyasyon direncinde rol oynadığı gösterilmiştir (Desideri *et al.* 2019). Ayrıca, GST'lerin aşırı ekspresyonu, kanserin ilerlemesi ve insan kanserlerinde ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir (Sharma *et al.* 2004).

PRDX'in türlerinden olan PRDX1 ve PRDX4'ün ekspresyonunun kanser dokularında yüksek olduğu ve kanser hücrelerinin sağkalımını desteklediği ve ayrıca, aşırı PRDX6 ekspresyonunun kanserin malign ilerlemesini hızlandırdığı saptanmıştır (Rofls *et al.* 2013).

Diğer antioksidan savunma sistemlerinden biri olan tiyoredoksin sistemin üyelerinden olan TRXR'nin ve tiyoredoksinin (TRX veya TXN) kanser hücrelerinin büyümesini desteklediği ve ilaç direncinde rol oynadığı saptanmıştır. Ayrıca karaciğer, kolorektal, pankreas, akciğer, servis ve meme dahil olmak üzere farklı kanserlerde yüksek seviyelerde TRXR ve TXN eksprese edildiği gösterilmiştir (Cha *et al.* 2009; Choi *et al.* 2002; Kim *et al.* 2003; Raffel *et al.* 2003).

Eksojen antioksidan savunma sistemlerinden karotenoid ve E vitamini gibi bazı endojen antioksidanların kanser insidansını artırdığı ve çeşitli kanser türlerinde kanserin ilerlemesinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca E vitamininin ferroptozu önleyerek kanser hücrelerinin ölümden kaçmasına neden olabildiği belirtilmiştir (Harris & DeNicola 2020).

Tiyoredoksin Sistem

Organizmalarda çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonları katalize eden ve ana işlev olarak redoks dengesini düzenleme rolünü üstlenen tiyoredoksin (Trx) sistem, hücrelerde glutatyon (GSH) sistemi ile H₂O₂'nin uzaklaştırılmasında birlikte hareket eden önemli bir indirgeyici enzim sistemidir (Arnér 2017; Johansson *et al.* 2004). Hem sitozol hem de mitokondride bulunan bu iki sistem arasındaki fark hücre içi konsantrasyonları olup tiyoredoksin sistem mikromolar aralıkta yer alırken glutatyon sistem milimolar aralığında yer alır. Aynı zamanda çoklu sinyalizasyon rolleri oynayan bu iki sistemin, yakın bir zamanda

mitokondride Trx sisteminin elemanlarından olan tiyoredoksin redüktazın glutatyon redüktazı (GR) indirgeyerek bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Johansson *et al.* 2004).

Trx sistemi, tiyoredoksin (TXN, TRX), tiyoredoksin redüktaz (TRXR), koenzim α -nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve doğal bir TRX inhibitörü olan tiyoredoksin etkileşimli proteinden (TXNIP) oluşur (Jia *et al.* 2019; Mahmood *et al.* 2013). Hücrelerde çok yönlü role sahip olan bu sistem, indirgenmiş hücre içi redoks ortamının kontrolü, oksidatif strese karşı savunma, fizyolojik süreçlerin kontrolü için sinyal iletiminin düzenlenmesi, hücresel büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptozun kontrolü gibi pek çok görevi tiyol bağımlı olarak tiyol-disülfid değişim reaksiyonları aracılığıyla üstlenmektedir (Arner & Holmgren 2006). Ayrıca kanser oluşumu üzerinde de etkisi olan bu sistemin hücre proliferasyonu, apoptoz, metastaz ve anjiyogenez ile yakından ilişkili olduğu da saptanmıştır (Bian *et al.* 2019). Yaşam için gereken biyolojik işlevleri yerine getiren bu sistemin önemi, sistemin elemanlarından olan TXN ve TRXR'yi kodlayan genlerden herhangi biri tarafından nakavt edilmiş farelerde embriyonik ölümcül bir fenotipin ortaya çıkmasıyla kanıtlanmıştır (Jakupoglu *et al.* 2005; Matsui *et al.* 1996; Nonn *et al.* 2003).

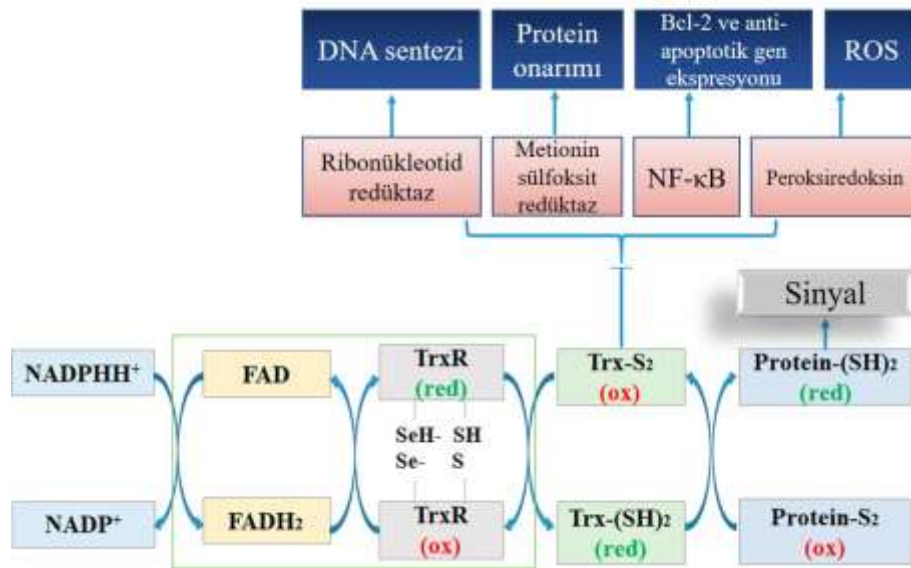
Tiyoredoksin

Tiyoredoksin (TRX), ilk olarak Laurent ve arkadaşları tarafından 1964 yılında *Escherichia coli*'de karakterize edilmiş olup mikroorganizmalardan insanlara kadar tüm organizmalarda varlığı tanımlanmıştır (Laurent *et al.* 1964). 12 kDa'lık bir protein olan TRX proteinleri, tüm organizmalarda dört tane α -heliks ve beş tane β -tabakasından oluşan ortak bir yapıyı paylaşmakla birlikte korunmuş bir redoks katalitik (aktif) bölgesine (–Cys–Gly–Pro–Cys–) de sahiptir (Berndt *et al.* 2008). Redoks aktif bölgede yer alan bu iki sistein rezidüsü sayesinde TRX indirgenmiş halindeyken oluşan ditiyol TRX (Trx-(SH)₂), hücresel ortamın indirgenmiş bir durumda korunmasında hayati bir rol oynamaktadır (Mahmood *et al.* 2013). İnsanlarda farklı genler tarafından kodlanan üç tane TRX formu keşfedilmiştir: sitozolik TRX (TXN1, TRX1), mitokondriyal TRX (TXN2, TRX2) ve sadece testislerde ifadesinin görüldüğü spermatozoada bulunan TRX (SpTRX/TRX3) (Gromer *et al.* 2004).

İnsanlarda beş ekzon bölgesinin dört intronla ayrıldığı belirlenen TXN1'i kodlayan gen, 13 kb'ın üzerinden bir alana yayılmış olup 9. kromozom üzerinde 9q31 bantlarında konumlanmıştır. Korunmuş redoks aktif bölgesindeki 32. ve 35. konumlarındaki sistein (Cys) rezidülerine ek olarak insan TXN1'de, bakterilerdekinden farklı olarak proteinin aktif bölgesinin 62, 69 ve 73. konumlarında onlara benzersiz biyolojik özellik sağlayan yapısal üç Cys rezidüsü daha mevcuttur. Bu rezidüler, tiyol oksidasyonu, glutatyonilasyon ve S-

nitrosilasyon gibi translasyon sonrası (posttranslasyonel) modifikasyonlara uğrayarak TXN1'in aktivitesini düzenler (Şekil 12) (Kiebal *et al.* 2015; Mahmood *et al.* 2013).

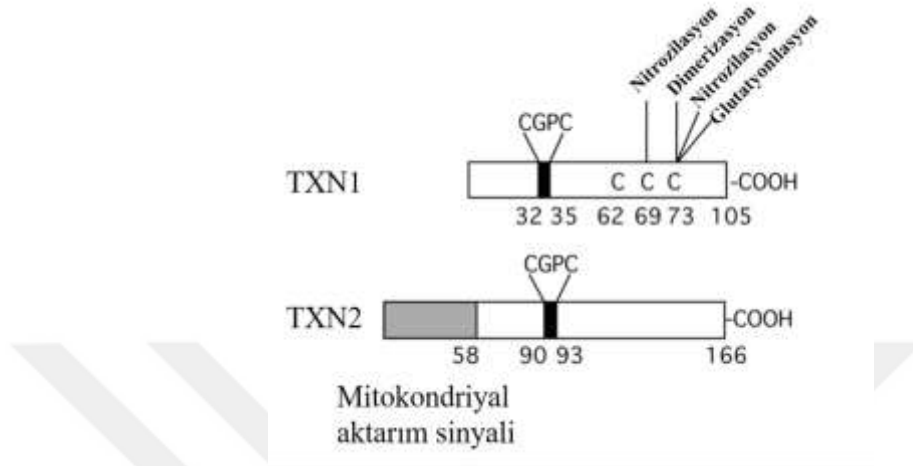
Hücre altı lokalizasyonuna bağlı olarak, TXN1 farklı rolleri üstlenmektedir. Çekirdek ve hücre dışı ortamda da bulunabilen TXN1, esas olarak sitoplazmada lokalize olur. Sitoplazmadaki formu bir redoks düzenleyicisi olarak işlev görür ve hücrelerde oluşan ROS'ları temizleyerek oksidatif olarak hasar görmüş proteinlerin onarımı ile veya peroksiredoksinlere (PRDX) elektron donörü olmasıyla antioksidan savunmada yer alır (Arner & Holmgren 2006; Koharyova *et al.* 2008). Ayrıca sitoplazmada belirli proteinlerin aktivitesini düzenler. TXN1, ribonükleotid redüktazın indirgenmesi için bir hidrojen donörü olarak davranması sonucunda ribonükleotid redüktaz tarafından hem DNA sentezi hem de DNA onarımı için gerekli olan deoksiribonükleotitlerin sentezi gerçekleşmiş olur (Laurent *et al.* 1964; Muri *et al.* 2018). TXN1'in indirgenmiş hali, apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1'e (ASK1) bağlanarak ASK1'in aktivitesini inhibe etmesi sonucunda apoptozu baskılayabilir. Bu inhibisyonun ortadan kalkması için ASK1'den ayrılmak üzere TXN1'in oksidasyonunun gerçekleşmesi gerekir (Biaglow *et al.* 2005). Çekirdekte ise TXN1, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α), redoks faktörü-1 (Ref-1), nükleer faktör kappa B (NF- κ B), tümör baskılayıcı P53, glukokortikoid reseptörü, östrojen reseptörü (ER) ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek gen ekspresyonunu düzenlemekte ve bu transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlama aktivitesini artırmaktadır. Hücre dışında yer alan TXN1'in de hem sitokin benzeri hem de kemokin benzeri aktivite sergilediği bildirilmiştir (Şekil 11) (Jia *et al.* 2019).



Şekil 11. Tiyoredoksin (Trx) sisteminin hücrelerdeki düzenleyici etkileri (Bian *et al.* 2019)

Mitokondriyal Trx sistemi; TXN2, TRXR2, NADPH ve peroksiredoksin-3'ten (PRDX3) oluşur ve beyin, karaciğer ve kalp gibi metabolik olarak oldukça aktif olan dokuların

mitokondrilerinde yüksek oranda eksprese edilir (Huang *et al.* 2015; Nishimura *et al.* 2011). TXN1'e kıyasla TXN2, aktif bölgesinde sadece iki tane yapısal Cys rezidüüsü içerdiğinden daha stabildir. Ayrıca TXN1'den farklı olarak TXN2'nin N-terminali mitokondriye aktarıma aracılık eden ve daha sonrasında parçalanan ek bir 58 amino asitlik bir dizi ile ifade edilir (Şekil 12) (Tanaka *et al.* 2002).

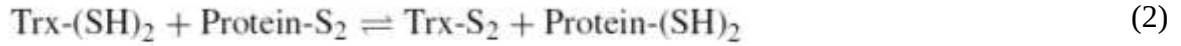
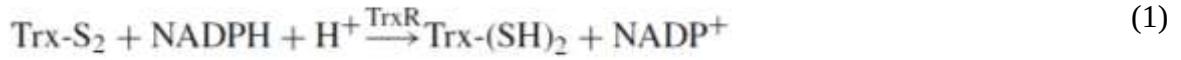


Şekil 12. Sitosolik ve mitokondriyal tiyoredoksin (TXN1 ve TXN2) proteinlerinin yapıları (Tonissen *et al.* 2009)

TRXR2 ve PRDX3 ile beraber TXN2, temel olarak mitokondriyal ROS'ların temizlenmesinde görev alır. Bu ROS oluşumunu inhibe etmesi ve ayrıca ASK1'in aktivitesini durdurması sonucunda, canlılarda kardiyak fonksiyonları korumaktadır. TXN2'nin eksikliği, oksidatif stresle ve oksidatif fosforilasyonun işlevsel bozukluğunun ortaya çıkmasıyla sonuçlanır ve bu durum erken başlangıçta nörodejenerasyona neden olmaktadır (Holzerova *et al.* 2016). Ayrıca hematopoez, kalp gelişimi ve kalp fonksiyonu için gerekli olan fonksiyonel TRXR2'nin herhangi bir nedenden dolayı eksikliğine bağlı olarak da embriyonik ölüm meydana gelmektedir (Conrad *et al.* 2004). TXN'nin aşırı eksprese olma durumunda ise hücrelerde ROS ile indüklenen apoptoza karşı bir direnç geliştirmekte ve kanser gelişimine de katkı sağlamaktadır (Chen *et al.* 2002).

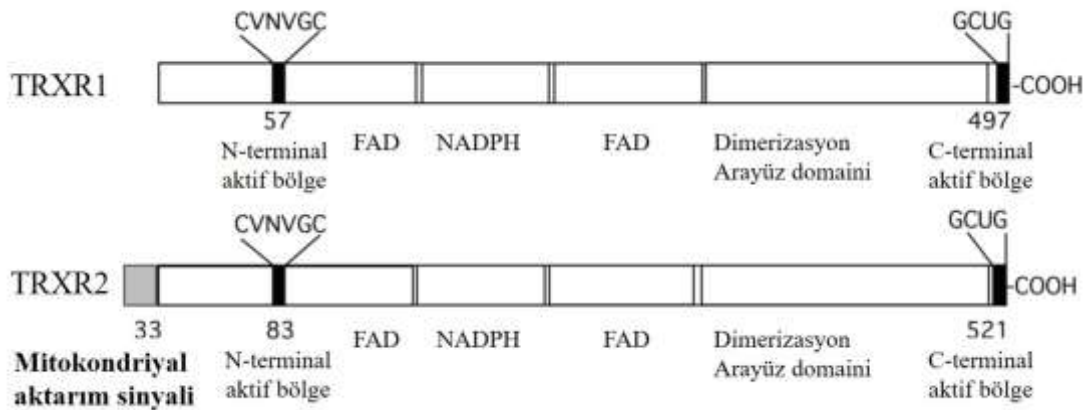
Tiyoredoksin redüktaz

Bir selenoenzim olan tiyoredoksin redüktaz (TRXR), NADPH'den aldığı elektronları, oksitlenmiş TRX'in (Trx-S₂) redoks aktif bölgelerindeki disülfidlere aktarımını katalizleyerek hücre içi redoks dengesini korur ve onu indirgenmiş form olan ditiyol TRX'e (Trx-(SH)₂) indirger (Jia *et al.* 2019). Bu indirgenmiş form da daha sonra elektronlarını proteinlerdeki disülfidlere aktararak proteinlerin indirgenmesini sağlar (Arner & Holmgren 2006).



Homodimerik flavoprotein olan TRXR, oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir ve insanlarda olan sitozolik (TRXR1), mitokondriyal (TRXR2) ve testise özgü (TGR / TXNRD3) olmak üzere üç spesifik TRXR izoenzimi vardır. Sitozolik olan form da kendi içerisinde üç ayrı hücre içi lokalizasyona sahiptir: sitoplazma, çekirdek ve hücre zarı (Arnér 2017). TRXR2 ise diğerlerinden temel olarak ek bir N-terminal mitokondriyal aktarım dizisine sahip olmasıyla ayrılmaktadır (Şekil 13) (Miranda- Vizuite *et al.* 1999).

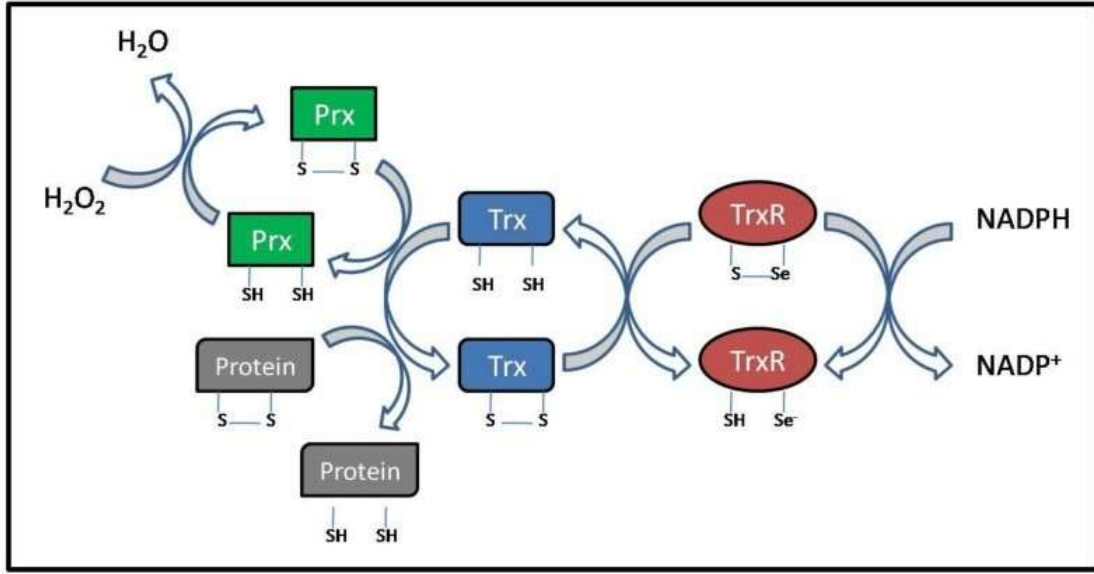
TRXR'nin iki redoks aktif merkezlerinden biri FAD-bağlanma domainlerinde yer alan korunmuş NADPH-bağlanma bölgesi N-terminal redoks-aktif merkezi (–Cys–Val–Asn–Val–Gly–Cys–) iken diğeri C-terminal kuyruğunda bulunan redoks-aktif merkezidir (–Gly–Cys–Sec–Gly–). TRXR'ler ikinci redoks aktif merkezlerinde bulunan ve seçici enzim inhibitörleri için iyi bir hedef olan selenosistein (Sec) rezidüsüne sahiptir (Şekil13) (Arnér 2017).



Şekil 13. Sitozolik ve mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz (TRXR1 ve TRXR2) proteinlerinin yapıları (U:selenosistein) (Tonissen *et al.* 2009)

TRXR, indirgeyici eşdeğerleri FAD yoluyla NADPH'den aynı alt birimin N-terminal redoks-aktif merkezindeki disülfide aktarır ve disülfidi bir ditiyol çiftine indirger. Daha sonra indirgeyici eşdeğerler diğer alt birimin C-terminali aktif bölgesine hareket eder ve onu bir selenol-tiyol çiftine indirger. Böylece indirgenmiş olan TRXR, daha sonra indirgeyici eşdeğerleri başta oksitlenmiş TXN olmak üzere glutaredoksin 2 (Grx2), protein disülfid

izomeraz (PDI) ve diğer küçük moleküller gibi çeşitli substratlara aktarır (Şekil 14) (Arnér 2009).



Şekil 14. Tiyoredoksin (Trx) sisteminin etki mekanizması (Karlenius & Tonissen 2010)

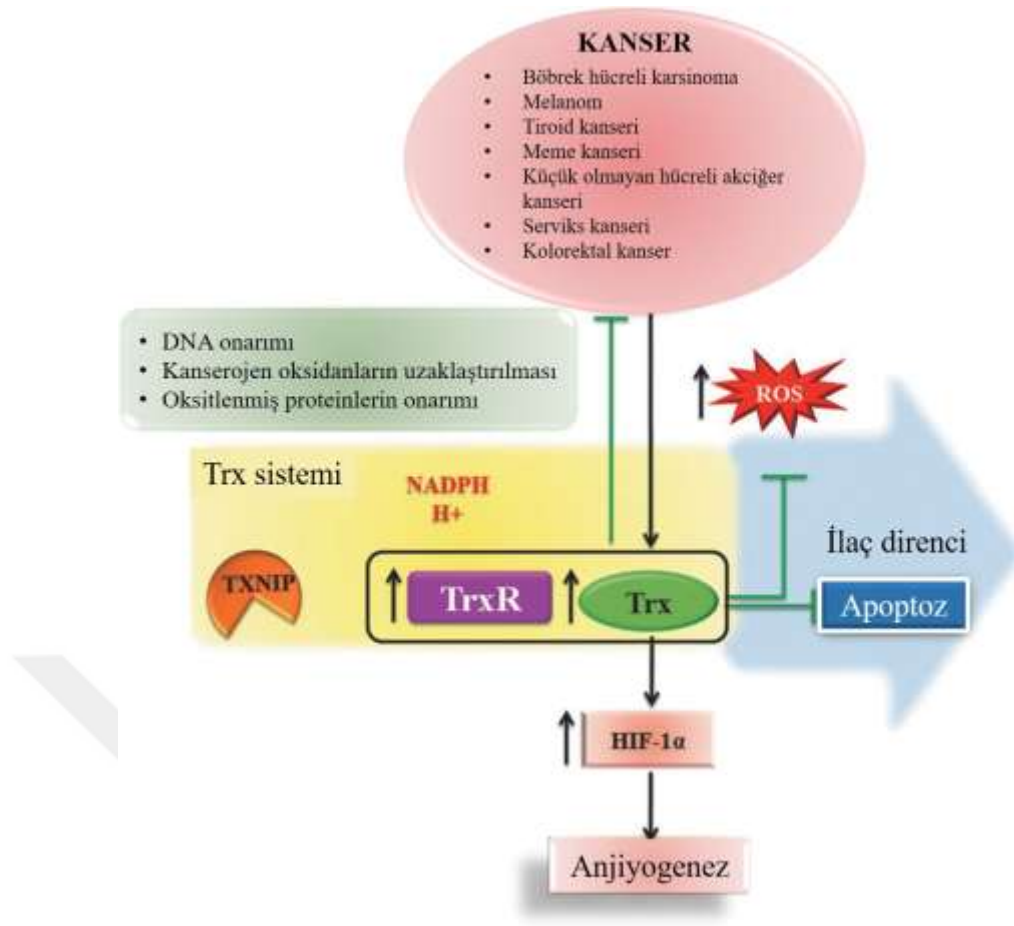
Tiyoredoksin etkileşimli protein

TXN1'in aktivitesini ve ekspresyonunu kontrol eden insan Trx-bağlayıcı protein-2 (TBP-2)/TXNIP, TXN1'in fonksiyonunun negatif düzenleyicisidir. Bu protein, TXN1'in aktif merkezi ile etkileşime girerek onun indirgeme aktivitesini inhibe etmektedir (Mahmood *et al.* 2013).

TXNIP'in ekspresyonu, UV ışınları, ısı şoku ve H₂O₂ gibi çeşitli stresler tarafından indüklenir (Minn *et al.* 2005). TXNIP'in aşırı ekspresyonu ise hücreleri oksidatif strese daha duyarlı hale getirerek hücrelerin apoptoza gitmesini teşvik eder (Shi *et al.* 2011). Bu inhibisyon etkilerine ek olarak, lipid ve glukoz metabolizmasında, inflamasyonda, kardiyak fonksiyonda ve karsinogenezde önemli roller oynar (Mahmood *et al.* 2013).

Tiyoredoksin sistem ve kanser

Çoğu kanser türünde, TXN ve TRXR, genellikle aşırı yüksek seviyelerde eksprese edilirken TXNIP düşük seviyelerde eksprese edilir. TXN ve TRXR'nin artan bu seviyeler, proliferasyon, invazyon, anjiyogenez, apoptozdan kaçış ve metastaz gibi tümör fenotiplerini ve özelliklerini korumak için gerekli olan çoğu kanser hücresinde saptanmıştır (Jia *et al.* 2019). Ayrıca bu ekspresyon seviyesindeki artışa yönelik regülasyon, tümör dokularını kemoterapiye ve radyoterapiye karşı daha dirençli olmaya yönlendirmektedir (Şekil 15) (Arnér 2017).



Şekil 15. Kanserde tiyoredoksin (Trx) sistemin rolü (Mahmood *et al.* 2013)

Trx sistemi, kanser hücreleri için DNA sentezinde kullanılmak üzere geniş bir deoksiribonükleotit rezervi oluşmasına sebep olabilir. Artan seviyelerdeki TXN sonucunda ribonükleotit redüktaz aktivitesini desteklemesi yoluyla DNA öncülerinin oluşumunu sağlamaktadır (Jia *et al.* 2019). Hem tiyoredoksin hem de glutaredoksin sistemlerinin elektron görevi gördüğü insan ribonükleotit redüktazı enziminin ekspresyon seviyelerindeki artışa sahip olan kanser türlerinde, deoksiribonükleotit ve DNA sentezinde elektron sağlamak için tiyoredoksinin veya glutaredoksinin görev aldığı düşünülmektedir (Hirota *et al.* 2000).

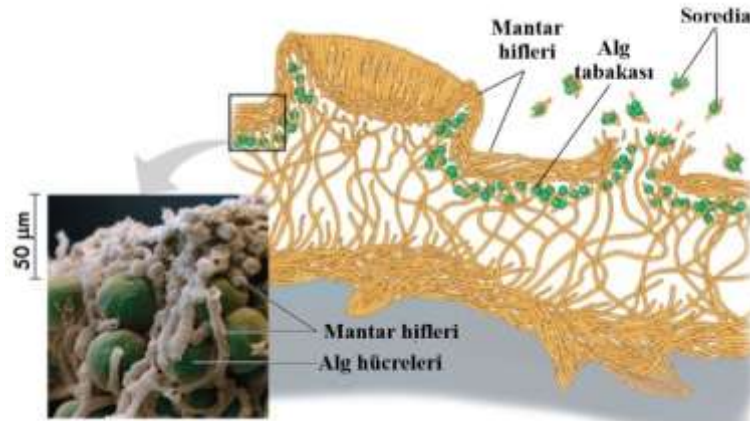
Ayrıca kanser hücrelerinin, sınırsız çoğalmak için aşırı telomeraz aktivitesi sergilediği bilinmektedir. TRXR'nin kanser hücrelerindeki bu telomer bakımını etkilemekte ve G2/M fazındaki hücre sayısını artırmaktadır (Gan *et al.* 2005).

ASK1'in inhibisyonu ile apoptozu inhibe eden indirgenmiş TXN, kanser hücrelerinde apoptoza karşı direnç koymaktadır. Ayrıca hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan P53 ile uyarılan apoptotik süreç için sağlam bir Trx sistemi gerektiği bildirilmiştir. Trx sisteminin apoptoza direnç göstermesinin bir başka yolu ise, peroksiredoksin aktivitesini ve oksidatif stres yoluyla apoptozun tetiklenmesine karşı koyan diğer antioksidan fonksiyonları desteklemesidir (Arner & Holmgren 2006).

TXN ve TRXR'nin kanserlerdeki artan bu seviyeleri ile bu proteinlerin çeşitli kanser türlerinde erken tanı sürecinde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi ve Trx sistem hedefli kemoterapi stratejilerinin geliştirilmesi, birçok bilimsel çalışma için araştırma konusu olmuş ve TRXR'nin kanser çalışmalarında seçici bir markır olarak kullanılabileceği ve kemoterapötik ajanlar tarafından hedef olabileceği kabul edilmiştir (Branco *et al.* 2014; Ouyang *et al.* 2018). Kanser tedavisinde FDA tarafından onaylanan mevcut antikanser ilaçlarının da yaklaşık %49'u bitki, bakteri, mantar ve deniz organizmaları gibi doğal ürünler ya da doğrudan bunlardan elde edilen ürünlerdir (Mondal *et al.* 2012). Bu ürünlerin kolayca elde edilmesi kolay olsa da birçok doğal kaynak bazlı ürünlerin etkileri araştırılmamış olup likenler, ürettikleri sekonder metabolitlerle bu doğal kaynaklar arasında yer almakta ve birçok liken sekonder metabolitinin kemoterapötik ajan olarak kullanılabilirliği araştırılmaktadır (Shrestha *et al.* 2015).

Likenler

Likenler, bir mikobiyont (mantar partneri) ile bir veya daha fazla ekolojik olarak zorunlu (obligat) biyotrof olarak fotosentez yapan tek hücreli veya filamentöz yapıli fotobiyont (fotoototrofik partnerleri: alg veya siyanobakteri) arasındaki simbiyotik ilişki ile oluşan kararlı, mutualist yaşam sergileyen ve biyolojik olarak aktif birçok düşük moleküler ağırlıklı sekonder metabolit kaynağı oluşturan mikroorganizmaların kompleks topluluklarıdır (Şekil 16) (Calcott *et al.* 2018; Molnár & Farkas 2010).



Şekil 16. Mikobiyont ve fotobiyontun simbiyotik birlikteliği ile oluşan liken hayatının şematik gösterimi (Honegger 2009)

Likenler, kutup bölgelerinden tropik bölgelere, ovalardan en yüksek dağlara kadar çok çeşitli habitatlarda ortaya çıkar. Örneğin kayaların içinde veya yüzeyinde, toprakta, ağaç gövdelerinde ve çalılıklarda, canlı yaprakların yüzeyinde ve ahşap, deri, cam, metal, beton gibi insan yapımı ürünlerin yüzeylerinde bulunabilirler. Çoğu liken karasal ortamlarda bulunurken bazı liken türleri tatlı su akıntılarında ve deniz intertidal bölgelerinde bulunur. Ayrıca likenler

aşırı sıcaklıklara, kuraklığa, su baskınlığına, tuzluluk oranına, yüksek hava kirletici konsantrasyonlarına ve besin açısından fakir, yüksek oranda nitrit bulunan ortamlara uyum sağlayarak ekstrem çevresel koşullarda da yaşayabilirler (Molnár & Farkas 2010; Nash 1996).

Liken birlikteliklerinde mikobiyont gibi davranan mantar partnerleri, tüm mantarların yaklaşık %21'lik kısmını kapsamaktadır. Tanımlanan bu dominant mikobiyontların %98'inden fazlası *Ascomycetes* şubesine aittir ve tüm *Ascomycetes*'lerin yaklaşık %50'si mutualist olan bu liken hayatını benimsemişlerdir. Bu mikobiyontların geriye kalan yaklaşık %0,3'lük kısmı ise *Basidiomycetes* şubesine aittir ve kalanların çoğu anamorfik mantarlardır yani eşeyssel üreme evresi olmayan çeşitli mantarlardır (Calcott *et al.* 2018; Honegger 1991).

Mikobiyontlar, likenlerde fotobiyontlar için uygun bir ortam sağlama; fotosentez, hidrasyon ve gaz değişimi gibi olaylar için geniş bir yüzey alanı oluşturma; aşırı sıcaklıklar ve zararlı ultraviyole radyasyon gibi olumsuz çevresel koşullarına karşı fotobiyontu koruma ve fotobiyontun optimum ışığa maruz kalmasını sağlama; mantar hifleri sayesinde koruyucu bir tabaka oluşturarak savunma; dış ortamdan konsantre ettiği fosfor, demir, çinko ve magnezyum gibi temel iz mineralleri ile simbiyozla besin maddesi olarak katkıda bulunma; fotobiyontlar ve liken tallusları için su ve CO₂ sağlamak gibi birçok görevi üstlenmektedir (Nguyen *et al.* 2013; Sanders & DE LOS R  OS 2016; Sigurbj  rnsd  ttir *et al.* 2016; Wösten & Wessels 1997).

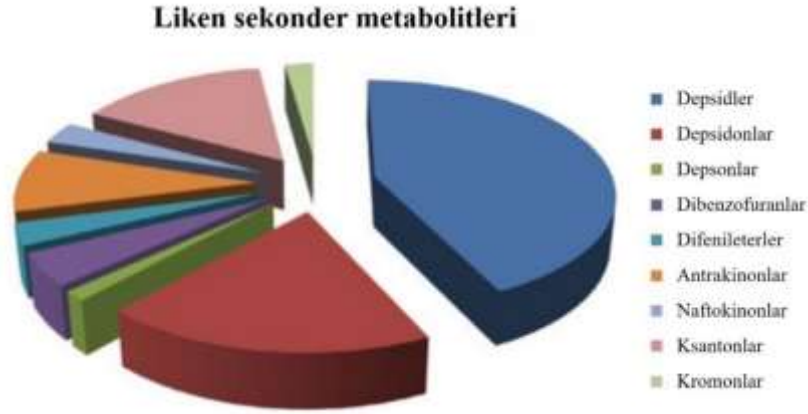
Likenlerin yaklaşık %95'i iki kısımlı olup mikobiyontun fotosentetik partneri klorobiyont (yeşil algal form, kloromorf) (likenlerin yaklaşık %85'i) veya siyanobiyonttan (siyanobakteriyel form, siyanomorf) (likenlerin yaklaşık %10'u) sadece biri olur (Honegger 2009). Geriye kalan yaklaşık %5'lik kısım ise     kısımlıdır yani mikobiyontun fotosentetik partneri olarak klorobiyont ve siyanobiyont birlikte bulunur ve bu likenler fotosimbiyodem olarak isimlendirilirler (Magain *et al.* 2012). Fotobiyont liken olu  şumuna katıldıktan sonra genellikle tek hücreli hale gelmeye teşvik edilmektedir ve eşeyli üremeleri baskılanmaktadır. Ayrıca liken olu  şumu esnasında mikobiyontun hücre duvarları, fotosentezle üretilen ve bir kısmı da  ğılan karbonhidratların mikobiyont tarafından kullanılabilmesi için daha geçirgen hale gelir ve böylece fotobiyontlar sayesinde mikobiyontlar enerji kaynağı edinmiş olur (Brodo *et al.* 2001).

Likenlerin yaklaşık %98'inin fotobiyontları t  r düzeyinde bilinmemekle beraber fotosentetik partner olarak 40 cins tanımlanmıştır ve bunların 25 tanesi alg (klorobiyont), 15 tanesi de siyanobakteridir (siyanobiyont). Fotobiyontlar arasında alger baskın olmasına rağmen likenlerde sadece birkaç farklı alg sınıfı tanımlanmıştır. Yeşil alg fotobiyontlarının en büyük grubunu *Trebouxiphyceae* oluşturmaktadır. Bir sonraki en yaygın klorobiyont ise *Trentepohlia* cinsinin türlerine aittir ve serbest ya  şayan filamentli yeşil alglerden, türetilen ve

klorofili maskeleyen turuncu bir karotenoid ile ayırt edilirler. Diğer küçük alg sınıfları ise yaygın olarak suda yaşayan likenlerde göze çarpıp bunların arasında altın alg *Heterococcus* ve kahverengi alg *Pteroderma maculiforme* yer almaktadır. Doygun haldeyken fotosentez yapabilen ve bunun sonucu olarak düşük ışıklı, nemli, besin açısından fakir habitatlara özellikle iyi adapte olabilen siyanobiyontlar arasında en yaygın olan fotobiyontlar ise *Nostoc*, *Scytonema* ve *Rhizonema* cinsine ait türlerdir. Siyanobakteriler dışında en baskın olan bakteri sınıfı Alphaproteobacteria olmasına rağmen, özellikle Burkholderiales ve Actinomycetales gibi sekonder metabolit üretimini zengin bir şekilde gerçekleştiren bakteriler de likenlerdeki bakteri popülasyonlarına katılmaktadır (Calcott *et al.* 2018). Klorobiyontlar ve siyanobiyontlar ürettikleri birincil metabolitleri açısından birbirinden ayrılırlar. Yeşil algal fotobiyontlar birincil metabolit olarak ribitol, eritritol ve sorbitol gibi şeker alkollerini üretirken siyanobakteriyel fotobiyontlar (siyanobiyotlar) glukoz üretir. Sonuç olarak üretilmiş olan bu karbonhidratlar mantarlara aktarılır ve mantarlar tarafından başka bir şeker alkolü olan mannitola dönüştürülerek depolanır. Ayrıca siyanobiyontlar, klorobiyontların aksine, atmosferden azot fikse etme yeteneğine sahiptir ve böylece simbiyozu ek bir besin katkısı sağlarlar (Brodo *et al.* 2001; Elix & Stocker-Wörgötter 2008).

Likenler tarafından üretilen metabolitler

Likenler tarafından üretilen metabolitler, primer ve sekonder metabolit olmak üzere ikiye ayrılır. Protein, amino asit, poliol, karotenoid, polisakkarit ve vitamin yapısında olan primer metabolitler, doğrudan hayati fonksiyonlarla ilgili ürünlerdir. Poliketid, polifenol, kinon, terpenoid, ksanton, dibenzofuran, depsid, depsidon, depson, terpenoid vb. yapısında olan sekonder metabolitler ise temel hayati fonksiyonlarla doğrudan ilgili olmayan ancak likenlere birçok avantaj sağlayan ürünlerdir (Şekil 17) (Cimmino *et al.* 2019). Çeşitli liken türlerinden ve bunların kültürlü simbiyontlarından tanımlanan 1000'den fazla sekonder metabolit likenlerin çevre koşullarına uyum sağlamasında, onları korumada, hayatta kalmasına ve büyümesine destek olmada ve ekosistemle ilişkileri düzenlemesinde çeşitli görevleri üstlenmektedir (Calcott *et al.* 2018).



Şekil 17. Liken sekonder metabolitlerinin yapısal dağılımlarının gösterimi (Le Pogam *et al.* 2015)

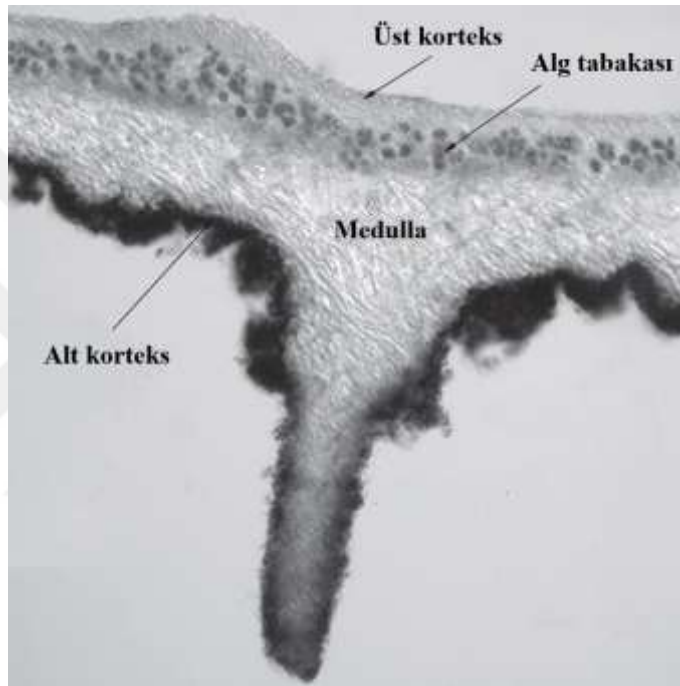
Nispeten düşük moleküler ağırlığa sahip olan sekonder metabolitlerin likenlerde oluşturdukları kimyasal profil, mikobiyont ile fotobiyont arasındaki iletişimden, kültür temelli çalışmalarda karbon kaynağından, UV-radyasyonu gibi çevresel etkenlerden ve mevsim, iklim, bulunduğu bölge gibi coğrafi durumlardan etkilenmektedir (BeGora & Fahselt 2001; Bjerke *et al.* 2004; Gauslaa *et al.* 2013). Ayrıca fotobiyont, mikobiyontun sekonder metabolizması üzerinde de bir etkiye sahiptir. Bazı çalışmalarda aksenik mikobiyont kültürleri veya mikobiyont ve fotobiyont içeren ko-kültürleriyle kıyaslandığında, liken oluşumuna katılan mikobiyontların daha farklı metabolit serisi ürettiği gösterilmiştir (Wrede *et al.* 2014). Başka bir çalışmada da fotobiyontları olmadan yetiştirilen mikobiyontların, belirli koşullar altında spesifik olarak sentezledikleri sekonder liken bileşiklerinden farklı, simbiyozda bulunmayan maddeler de sentezlediği belirtilmiştir. Ayrıca simbiyotik bakteriler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin, simbiyotik olmayan bakterilerde nadir görüldüğü saptanmıştır (Brunauer *et al.* 2007).

Üretilmiş olan bu metabolitlerin %15,5'inin mantar ve %17,6'sının bakteri orjinli olduğu, %7,6'sının mantar ve bakteri bileşiklerine benzer olduğu ve %59,3'ünün ise kültürlenebilir bakteri ve mantarların ürettiği bileşiklerle alakasız olduğu belirlenmiştir. Bakteri orjinli bileşiklerden sadece %12'si tatlı su siyanobakteri örnekleri tarafından üretilen bileşiklere benzemektedir. Siyanobiyontlar 1.100'den fazla eşsiz sekonder metabolit üretmektedir ve genomları sıklıkla yüksek sayıda biyosentetik küme içerir. Sekonder metabolit üretimine ayrıca büyük katkı sağlayan bakteri popülasyonları *Burkholderiales* ve *Actinomycetales* cinsleridir. Ancak izole edilebilen liken sekonder metabolitlerinin büyük çoğunluğu mantar orjinlidir (Calcott *et al.* 2018).

Liken metabolitleri poliketit yolu (asetil – polimalonil yolu), mevalonik asit yolu ve şikimik asit yolu olmak üzere üç farklı biyosentez yolundan biri tarafından üretilmektedir.

Sekonder metabolitlerin çoğu ise poliketit yolağından, geri kalan kısımlar ise mevalonik asit ve şikimik asit yollarından üretilmektedir (ÖZYİĞİTOĞLU *et al.* 2017).

Likenlerde alt ve üst korteks, alg tabakası ve medüller olarak adlandırılan kısımlar göze çarpmaktadır (Şekil 18). Mikobiyontlar tarafından üretilen metabolitler kortekste veya medüller katman içerisinde birikirler. Ayrıca çeşitli sekonder metabolitler, mantar hiflerinin dış yüzeylerinde hücre dışı minik kristaller oluşturacak şekilde bulunurlar. Bu konumlandırılma durumları da simbiyotik hayata katkıda bulunmaktadır. Örneğin korteks tabakasında bulunan kortikal liken bileşikleri, alg tabakası için bir çeşit ışık filtresi olarak kabul edilmektedir (Cimmino *et al.* 2019; Molnár & Farkas 2010).



Şekil 18. Liken simbiyotik yaşama ait kısımlar (Molnár & Farkas 2010)

Liken sekonder metabolitlerinin genel etkileri

Deneyisel yöntemlerle liken sekonder metabolitleri hakkında birçok bilgi edinilmesine rağmen simbiyotik yaşamdaki işlevleri hakkında hala net bilgiler elde edilememiştir. Yapısal olarak birbirlerine çok benzer olan metabolitler arasında bile çok farklı biyolojik etkilerin olduğu gözlemlenmiştir. Birçoğunun da çoklu biyolojik aktivite sergilediği bilinen bu metabolitlerin liken talluslarını zararlı otlara, patojenlere, rakiplerine ve yüksek UV ışınması gibi dış faktörlere karşı koruduğu düşünülmüştür. Araştırmalar sonucunda ise genel fonksiyonlarının antioksidan aktivite, simbiyoz gelişimi, metal homeostazisi ve kirlilik toleransı, fotokoruma, allelopati, antimikrobiyal, antiviral ve antifungal aktivite, antiherbivor ve böcek öldürücü aktivitesi, antikanser aktivitesi, antipiretik ve analjezik etki olduğu belirlenmiştir (Molnár & Farkas 2010).

Antioksidan aktivite

Hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit gibi reaktif azot türleri hücrelerde kimyasal süreçlerde önemli rol oynamasına rağmen bu serbest radikaller hücrelerde proteinlere, nükleik asitlere ve hücre zarındaki doymamış yağ asitlerine saldırarak hasara neden olmaktadır. Bu serbest radikallerin zarar verici etkileri ise çeşitli antioksidan savunma sistemleri tarafından giderilmeye çalışılmaktadır. Bu radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında denge kurulamadığı takdirde hücrelerde oksidatif stres durumu meydana gelmektedir. Likenlerde ise bu oksidatif stres durumu liken talluslarında meydana gelir ve sekonder metabolitler, UV ışığı tarafından üretilen serbest radikallere karşı koruma sağlar (Marante *et al.* 2003). Bu yüzden oksidatif stres durumuna karşı likenler bunu elemine etmek için sekonder metabolit üretimine yönelirler. Örneğin Antarktika'daki düşük sıcaklık, kuraklık, kış karanlığı, yüksek UV-B ve güneş ışını gibi ekstrem koşullar oksidatif stresin artmasına neden olur. Bunun sonucu olarak da Antarktika likenlerinin daha fazla miktarda antioksidan madde içerdiği ve bu madde içeriğinin tropik ve ılıman likenlerinkinden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Luo *et al.* 2009). Bu maddeler fenolik grup içerdiklerinden dolayı zararlı olan bu serbest radikalleri yok edebilme yeteneğine sahiptirler. Dolayısı ile liken ve liken metabolitlerinin doğal antioksidanlar için yeni kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir (Molnár & Farkas 2010).

Metal homeostazı ve kirlilik toleransına etkisi

Metal homeostazında ve kirlilik toleransında genel bir rol oynayan liken sekonder metabolitleri ağır metal birikimine karşı hassas olup bu hassasiyetleri türe özgüdür (Molnár & Farkas 2010). Ağır metallere maruz kalan likenlerde bazı sekonder metabolitlerinin miktarının azaldığı bazılarının ise ağır metallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için metabolit miktarlarının arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Hauck & Huneck 2007; Hauck 2008). Bu çalışmalar doğrultusunda bu liken metabolitlerinin belirli metal katyonlarının alımını teşvik ederek likenlerde metal homeostazisini kontrol ettiği, diğerlerinin adsorpsiyonunu azalttığı ve böylece likenlerin kirli alanlarda ağır metallere karşı toleransının arttığı belirlenmiştir (Molnár & Farkas 2010).

Fotokoruma

Likenler, yüksek ışık seviyelerine ve UV ışınlarının zararlı etkilerine karşı klorobiyontlarını korumak için alg tilakoid membranlarındaki ksantafil döngüsü ve liken metabolitlerinin ışık taraması ve UV-B koruması gibi stratejiler kullanmaktadır. Örneğin ışık tarama stratejisinde kortikal kısımda biriken liken bileşikleri sayesinde üst korteksin opaklığı

artmakta ve bunun sonucunda alg katmanına ulaşan yüksek olay ışması azaltılmaktadır. Burada görev alan ışık tarama pigmentleri (parietin, usnik asit, vulpinik asit gibi), gelen ışığı emerek fotobiyontu yoğun radyasyondan korumaktadır ve alg katmanına ulaşan güneş ışınlarını düzenlemektedir (Solhaug & Gauslaa 1996). Ayrıca fotosentezi inhibe eden ve DNA'ya zarar veren UV-B ışınları, birkaç liken sekonder metabolitleri (atranorin, kalisin, pinastrik asit, pulvinik asit, rizokarpik asit, usnik asit, vulpinik asit gibi) tarafından güçlü bir şekilde emilerek bu ışınlar karşı liken bileşikleri filtre görevini üstlenmektedir. Bu metabolitlerin sentezini ise UV-B ışınları tetiklemektedir (Galloway 1993). Ayrıca UV-B ışınlarına karşı fotokoruma sağlayan bazı liken sekonder metabolitlerinin (atranorin) floresans karaktere sahip olmalarından dolayı bu bileşiklerden yayılan ışıklar algler tarafından fotosentezde kullanılarak fotobiyont için fayda sağlamaktadır (Rao & LeBlanc 1965).

Allelopati

Liken sekonder metabolitleri; ışık, substrat, besin ve su için rekabet eden komşu likenlerin, yosunların ve vasküler bitkilerin yanı sıra mikroorganizmaların gelişimini ve büyümesini etkileyerek allelopatik ajan (allelkimyasallar olarak adlandırılır) olarak işlev göstermektedir. Bu allelopatik ajanlar ortama salınarak diğer organizmaların fotosentez, solunum, terleme, protein ve nükleik asit sentezi, iyonların zardan taşınımı ve iyon zarı geçirgenliği gibi temel hücresel fonksiyonları etkileyebilmektedir. Örneğin liken birlikteliğine katılmayan diğer mantarların istilasına karşı vulpinik asit ve evernik asit, saldıran mantarlarda aksospor germinasyonunu engelleyerek etki göstermektedir. Liken metabolitleri, bitkiler üzerindeki allelopati özelliğini bitkilerin büyümesini inhibe ederek veya büyük ölçüde geciktirerek göstermektedir (Lawrey 1995; Macias *et al.* 2007).

Antimikrobiyal aktivite

Likenler doğadaki patojenlerin çoğuna karşı antimikrobiyal, antiviral ve antifungal olacak şekilde savunma sağlayan sekonder metabolitler sentezlemektedir. Bunlara örnek olarak fisodik asit, atranorin, lekanorik asit, usnik asit, evernik asit ve vulpinik asit verilebilir. Bu sonuçlara göre liken sekonder metabolitleri, antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ajan olarak yeni kaynak oluşturma potansiyeline sahiptir (Halama & Van Haluwin 2004; Paudel *et al.* 2008; Schmeda- Hirschmann *et al.* 2008).

Antiherbivor ve böcek öldürücü aktivitesi

Likenler böcekler, akarlar, salyangozlar, sümüklü böcekler, lepidopteran larvaları, karibu ve ren geyiği gibi herbivorlar tarafından besin olarak tüketilmektedir. Ancak bu duruma likenlerin bitki örtüsü, muhtemelen düşük beslenme kalitesi, kendilerine özgü yapısal

özellikleri ve savunma bileşikleri sentezlemesi nedeniyle nadir olarak rastlanmaktadır. Ayrıca herbivorların gıda olarak likenleri tercih etmelerinde de liken sekonder metabolitleri önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin usnik asit ve vulpinik asidin güçlü bir şekilde gelişimini geciktirerek böcek öldürücü etkisini gösterdiği ve larva süresini doza bağlı olarak artırdığı belirtilmiştir. Bu yüzden zararlı sentetik kimyasalların pestisit olarak kullanımı yerine doğal ve çevreye daha az zararlı etkisi olduğu bilinen bu liken sekonder metabolitlerinin iyi birer pestisit olabileceği düşünülmüştür (Asplund & Gauslaa 2008; Nimis *et al.* 2006; Pöykkö & Hyvärinen 2003).

Antikanser etkisi

DNA'ya zarar vermeden ve hastanın ilerleyen yaşamında ikincil malignitelerin gelişimine neden olmayan yan etkilerin az olduğu kanser tedavilerinin araştırılması büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Bu nedenle doğal ortamlarda bulunan daha az yan etkisi olabilecek yeni antikanser ilaçları araştırılmaya başlanmıştır. Birçok liken sekonder metabolitinin de antikanser etkisinin varlığı incelenmiş ve saptanmıştır. Bunlara örnek olarak, usnik asit, atranorin, parietin, salazinik asit, evernik asit, vulpinik asit, difraktaik asit, lekanorik asit, lobarik asit gibi birçok sekonder metabolit verilebilir. Bu liken sekonder metabolitlerinin ise çeşitli antikanser mekanizmalarını kullanarak bu etkiyi sağladığı gösterilmiştir (Şekil 19) (Shrestha & Clair 2013; White *et al.* 2014).



Şekil 19. Liken metabolitlerinin olası antikanser mekanizmalarının şematik gösterimi. Düz çizgiler, mekanizmayı bildiren çalışmaların bulunduğunu gösterirken noktalı çizgiler, mekanizmayı bildiren hiçbir çalışmanın bulunmadığını göstermektedir (Kim *et al.* 2015)

Antipiretik ve analjezik etki

Bazı liken sekonder metabolitlerinin ağrıyı etkili bir şekilde hafiflettiği ve bazı memelilerde ateş ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Örneğin usnik asit, sıçanlarda pençe ödemi azalttığı ve önemli derecede doza bağlı olarak anti-inflamatuar etki gösterdiği

belirlenmiştir (Vijayakumar *et al.* 2000). Bir başka çalışmada ise difraktaik ve usnik asitlerinin farelerde analjezik etkiye, usnik asidin ise lipopolisakkaritlerin tetiklediği ateşe karşı antipiretik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden liken sekonder metabolitlerinin insanlar üzerinde de etkili olabileceği düşünülmektedir (Yamamoto 1995).

Birçok yararlı biyolojik aktiviteye sahip olan bu liken sekonder metabolitlerinin kullanımını kısıtlayan birçok durum söz konusudur. Likenlerden elde edilecek olan bileşiklerin aydınlatılması ve çalışmalarda kullanılabilmesi için gereken yeterli miktarlarda bileşiklerin, oldukça yavaş büyüyen ve kompleks yapıya sahip olan likenlerden saflaştırılmasının zor ve zahmetli olmasından dolayı çalışmaların yürütülmesi oldukça zorlaşmaktadır. Ayrıca liken ve liken bileşiklerinin (atranorin, difraktaik asit, evernik asit, lobarik asit, usnik asit vb.) hassas kişilerde alerjik reaksiyonlara (alerjik dermatit, fotokontakt dermatit, eritem, kaşıntı, ölçeklenme, rinit ve astım vb.) neden olması da likenlerin kullanımını kısıtlamaktadır (Calcott *et al.* 2018; Molnár & Farkas 2010).

KURAMSAL TEMELLER

En yaygın karaciğer malignitesine sahip olan HCC'nin doğru tespiti ve erken tanısı hasta sağkalımı için çok önemlidir. Bunun için klinik uygulamalarda sirotik hastalardan onları ayırt edecek yeni serum biyobelirteçlerini belirlemek amacıyla Reichl ve Mikulits (2016) Anneksin A2, reseptör tirozin kinaz Axl'nin çözünür formu ve tiyoredoksinin (TXN1) tanısı kullanılabilişliğini ölçmüş ve AFP ile kombinasyonlarını değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre AFP-negatif hastaların %69,2'sinin tiyoredoksin tarafından saptanabildiğini bildirmişlerdir (Reichl & Mikulits 2016).

Yoo ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan çalışmada akciğer kanseri hücrelerini spesifik olarak TRXR1'e yönelik siRNA ile transfekte etmelerinin ardından, bu hücrelerin tümör morfolojilerini büyük ölçüde tersine çevirdiği ve normal hücrelere benzer şekilde geri dönen büyüme özellikleri gösterdiği saptanmıştır (Yoo *et al.* 2006).

TRXR1 geninin nakavt edildiği farelerde karaciğer kanserojenine maruz bırakıldıktan sonra farelerde kimyasal olarak indüklenen karaciğer kanseri için önemli ölçüde artan bir insidans gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, TRXR'nin kanserlerdeki ikili rolünün, kanser gelişim evresine ve dokulara da bağlı olabildiği bildirilmiştir (Carlson *et al.* 2012).

Sheth ve arkadaşları (2006) tarafından HCC fare modelleriyle yapılan bir çalışmada, TXNIP yokluğunda AFP ve P53 seviyelerinin arttığı ve farelerde kanser gelişiminin meydana geldiği belirlenmiştir (Sheth *et al.* 2006).

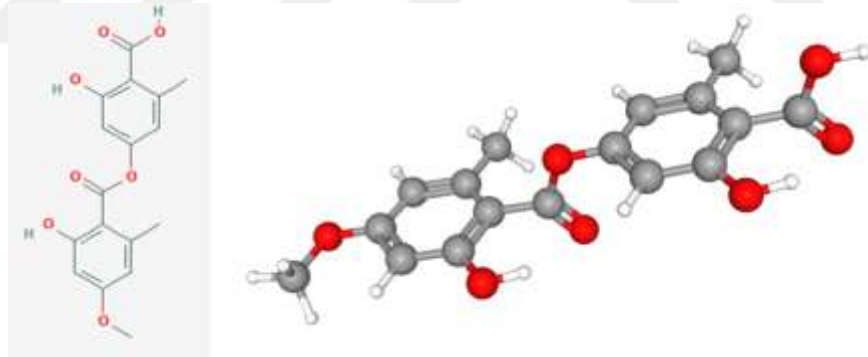
Zhang ve arkadaşları (2019), piperlonguminin denilen bir alkaloidin HCC hücrelerindeki etkisini incelemiş ve TRXR1'i hedefleyerek hücre içindeki ROS'un arttığını ve hücrelerde ölümcül endoplazmik bir stresin meydana geldiğini göstermişlerdir (Zhang *et al.* 2019).

TRXR'nin inhibisyonu ile hepatoselüler karsinom SMMC-7721 hücrelerinin büyümesini baskılayıp baskılayamayacağı antisens yaklaşımı ile araştırılmış ve TRXR antisens RNA'sının TRXR mRNA seviyesini ve aktivitesini önemli ölçüde azaltabildiği ve SMMC-7721 hücrelerinin büyümesini baskılayabildiği gösterilmiştir. TRXR antisens RNA'nın, G2/M fazında hücre döngüsü birikimi, P53 mRNA seviyesinde bir artış ve BCL2, insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT) mRNA seviyelerinde bir azalış ile SMMC-7721 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (Gan *et al.* 2005).

Bir başka çalışmada bazı antikanser ajanlarının (sisplatin, kalsiyum folinat, korboplatin, epirubisin HCl, doksorubisin HCl, paklitaksel, etoposid, florourasil) fare karaciğerlerinden izole edilen mitokondriyal TRXR ve sitozolik GST enzimleri üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre tüm ilaçların TRXR2 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu ancak her iki enzim için ortak olarak tek bir antikanser ajanının (methotrexate) inhibisyon etkisi olduğu saptanmıştır (Ozgencli *et al.* 2018).

Ozgencli ve arkadaşları (2008), akciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TRXR enzimi üzerine bazı liken asitlerinin (difraktaik, evernik, lobarik, lekanorik ve vulpinik asit) etkilerini incelemiş ve sisplatin ve doksorubisin antikanser ajanlarına kıyasla özellikle lekanorik ve vulpinik asit olmak üzere araştırılan liken asitlerinin TRXR2 enzimine karşı daha güçlü inhibisyon etkisinin olduğunu *in vitro* olarak göstermişlerdir (Ozgencli *et al.* 2018).

C₁₇H₁₆O₇ kapalı formülüne sahip olan depsid yapısındaki evernik asit (Şekil 20), *Evernia prunastri* ve *Pseudoevernia furfuraceae* gibi likenlerde bulunan bir sekonder metabolittir. Bu bileşiğin antioksidan, antimikrobiyal ve antikarsinogenik etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Kosanić *et al.* 2013). Ayrıca evernik asidin likenlerin yakın çevrelerinde yaşayan yosunların büyümesini ve spor üretimini inhibe ederek alleopatik etki gösterdiği saptanmıştır (Calcott *et al.* 2018).



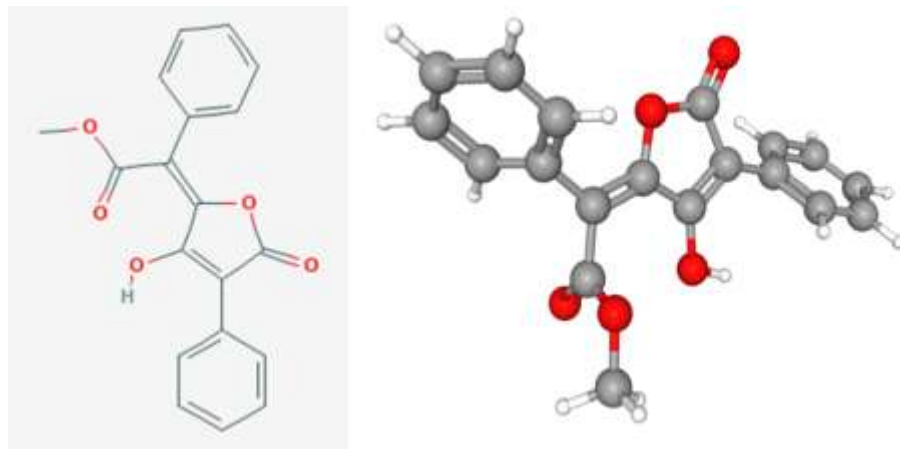
Şekil 20. Evernik asidin kimyasal yapısı ve 3 boyutlu (3D) yapısının gösterimi (Anonymous 2021a)

Evernik asidin de incelendiği bir çalışmada usnik asidin, salazinik asidin, vulpinik asidin, jiroforik asidin ve evernik asidin MM98 malign mezotelyoma, A431 vulvar karsinom ve HaCaT keratinositlerinde hücre proliferasyonunu veya yara iyileşmesini etkileme yetenekleri araştırılmıştır. Her üç hücre hattı için usnik asit yüksek derecede ve vulpinik asit orta derecede toksisite gösterirken salazinik, jiroforik ve evernik asit düşük derecede toksisite göstermiştir. HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirme etkileri ise usnik ve jiroforik asitte güçlü derecede, vulpinik ve salazinik asitte orta derecede iken evernik asitte daha az olmuştur (Žugić *et al.* 2018).

Eksojen H₂O₂'nin oksidatif stres aracılı sitotoksositeye neden olduğu merkezi sinir sistemi benzeri hücrelerin (U373-MG insan astrositom ve SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hatları) iki modelinde evernik asidin ve usnik asidin radikal temizleme kapasiteleri (ORAC ve DPPH testleri ile) incelenmiştir. Her iki hücre hattında da evernik asit H₂O₂ kaynaklı sitotoksik hasara karşı önemli bir koruma göstermiş, oksidatif stres markörlerindeki (ROS üretimi, glutasyon sistemi ve lipid peroksidasyon seviyeleri dahil) ve hücrel apoptozdaki (kaspaz-3 aktivitesi) değişiklikleri tersine çevirmiştir. Hücre içi faz-II antioksidan enzimlerinin ekspresyonunda ise belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, evernik ve usnik asitlerinin çeşitli oksidatif stresle ilişkili hastalıkların tedavisinde umut verici birer antioksidan adayı olabileceği ve daha fazla araştırılması gerektiği belirtilmiştir (Fernández-Moriano *et al.* 2017).

Aoussar ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada, *Evernia prunastri* (*E. prunastri*), *Ramalina farinacea* (*R. farinacea*) ve *Pseudevernia furfuracea* (*P. furfuracea*)'nın aseton ile hazırlanan ekstraktlarının kimyasal ve sitotoksik bileşimi, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Fitokimyasal analizin bulguları incelenen likenlerin fizyodalik asit, evernik asit ve usnik asit gibi ilginç biyoaktif moleküllerin yanı sıra protocetrarik asit içerdiğini gösterilmiştir. Bu ekstraktların insan prostat kanseri (22RV1), insan kolon karsinomu (HT-29), HepG2 ve Hamster yumurtalık kanseri (CHO)'ne karşı önemli sitotoksik etkiler göstermediği söylenmiştir (Aoussar *et al.* 2020).

Vulpinik asit (C₁₉H₁₄O₅), ilk olarak *Letharia vulpina*'dan izole edilen furan yapısındaki bir lakton olup kimyasal yapısı ilk olarak 1881'de formüle edilmiştir (Şekil 21) (Cimmino *et al.* 2019). Şikimik asit yolağı üzerinden sentezlenen sarı renkli bu bileşik ilk olarak 1925 yılında Mazza tarafından izole edilmiştir (Mazza 1925).



Şekil 21. Vulpinik asidin kimyasal yapısı ve 3D yapısının gösterimi (Anonymous 2021b)

Pek çok çalışmada antikanser etkisinin kanıtlandığı vulpinik asidin, fotobiyontların hücre bölünmesini kontrol ederek simbiyotik gelişime katkı sağladığı bulunmuştur. Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösteren vulpinik asidin ayrıca mantarlarda spor gelişimini inhibe etmesiyle de antifungal aktiviteye sahip olduğu ve alleopatik etki gösterdiği, böcek larvalarının beslenmesini engelleyerek de antiherbivor etki sergilediği belirtilmiştir (Burlando *et al.* 2009). Ayrıca likenlerin UV ışınlarına maruz kalması sonucunda vulpinik asit miktarlarının artarak UV ışınlarını absorblamasının bir sonucu olarak bu sekonder metabolit fotokorumada görev almaktadır (Calcott *et al.* 2018).

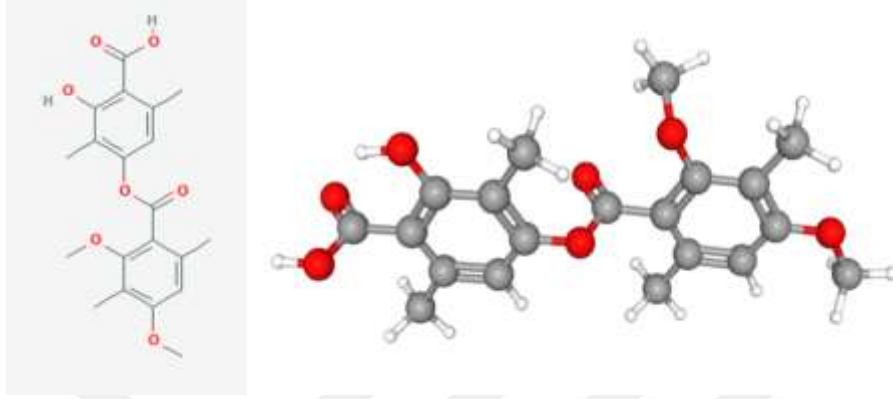
Vulpinik asidin, UV-B'ye maruz bırakılan insan keratinosit hücreleri üzerindeki fotokoruyucu aktiviteleri ve işlem görmemiş hücreler üzerindeki yıkıcı etkileri *in vitro* deneylerle incelenmiştir. Sonuç olarak doza bağlı şekilde vulpinik asidin UV-B'nin sitotoksik, apoptotik ve hücre iskeleti değiştirici faaliyetlerini önlediği ve normal keratinosit hücreleri üzerinde hiçbir toksik, apoptotik veya hücre iskeleti değiştirici etkisi olmadığı gösterilmiştir (Varol *et al.* 2016).

Pulveroboletus ravenelii'den elde edilen ekstraktların, dört akciğer adenokarsinom hücre hattı (A549, NCIH1264, NCIH1299 ve Calu-6), iki pankreas duktal adenokarsinoma hücre hattı (PANC-1 ve MIA PaCa-2) ve bir hepatoselüler karsinom hücre hattı (HepG2) hücrelerine karşı etkileri *in vitro* sitotoksik etkileri incelenmiştir. En sitotoksik ekstraktın ana bileşeni olarak vulpinik asit tanımlanmış olup sitotoksitesinin altında yatan temel mekanizmaları anlamak için ayrıca apoptotik incelemeler yapılmıştır. Sonuçlara göre vulpinik asidin PARP'nin bölünmüş formunun seviyesini artırmasıyla apoptozu indükleyerek *in vitro* sitotoksik aktivite gösterdiği ve kaspaz-3 ve/veya kaspaz-7'yi aktive ederek apoptotik hücre ölümünü sağlamasının muhtemel olacağı bildirilmiştir (Kim *et al.* 2017).

Kılıç ve arkadaşları (2018) tarafından vulpinik asidin sitotoksik etkisi ve moleküler düzeyde apoptotik etkisi kanser hücre hatlarında (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD Wehi) ve normal hücrelerde (Vero and L929) araştırılmıştır. İncelenen tüm kanser hücrelerinde Bax, Bcl2 ve P53 genlerinin mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında, Bax geninin Bcl-2 ve P53 genlerine kıyasla daha fazla ekspresyon artışı gösterdiği gözlenmiştir (Kılıç *et al.* 2018).

Vulpinik asidin, önemli ölçüde insan meme kanseri hücrelerinin hücre canlılığını inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu asidin meme kanseri hücre hatlarında apoptoza bağlı genlerin (P53) ekspresyonu ile ilişkili moleküler mekanizmalar üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. P53 gen ekspresyonunun vulpinik asit ile muamele sonrasında sağlıklı meme epitel hücre hattına kıyasla kanserli SK-BR-3 hücre hattında oldukça arttığı ve kanserli hücrelerde apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır (Kılıç *et al.* 2018).

Başta *Usnea* cinsine ait liken türleri olmak üzere *Usnea diffracta*, *Protousnea magellanica*, *Usnea subcavata*, *Usnea longissima* türlerinden izole edilen difraktaik asit ($C_{20}H_{22}O_7$) depsid grubuna ait bir sekonder metabolit (Şekil 22) olup antioksidan ve mide koruyucu, bağışıklık uyarıcı, antikanserojenik, analjezik ve antipiretik etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (White *et al.* 2014).



Şekil 22. Difraktaik asidin kimyasal yapısı ve 3D yapısının gösterimi (Anonymous 2021c)

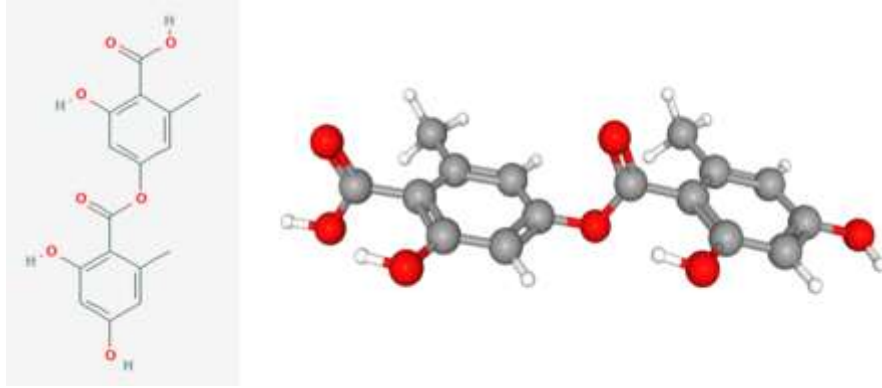
Çeşitli likenlerden izole edilen difraktaik asidin de içinde bulunduğu birkaç liken metabolitlerinin UACC-62 ve B16-F10 melanom hücrelerine ve 3T3 normal hücrelerine karşı sitotoksitesi değerlendirilmiştir ve difraktaik asidin her iki melanom hücre hattına karşı orta derecede sitotoksik olduğu belirlenmiştir (Brandão *et al.* 2012).

Truong ve arkadaşları (2014) tarafından *Usnea aciculifera*'dan difraktaik asidin de aralarında bulunduğu 12 liken metaboliti izole edilerek kimyasal yapıları hem 1D ve 2D NMR spektroskopisi hem de HR-ESI-MS analizi ile aydınlatılmıştır. Ardından izole edilen bu bileşiklerin HeLa (insan epitelyal karsinomu), NCI-H460 (insan akciğer kanseri) ve MCF-7 (insan meme kanseri) hücre hatlarına karşı etkileri değerlendirilmiştir ve sonuç olarak difraktaik asidin üç hücre hattında da büyümeyi inhibe ettiği ve güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Truong *et al.* 2014).

Kızıl ve Agar (2017) tarafından difraktaik asidin A549 ve AGS kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri belirlenmiş ve Topo II α , kaspaz-3 ve P53'ün gen ekspresyon değişiklikleri incelenmiştir. Bu asidin farklı dozlarının A549 kanser hücre hattında Topo II α geninin ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak proliferasyonu inhibe ettiği, CASP3 ve P53 genlerinin ekspresyonunu artırdığı ve AGS hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Kızıl & Ağar 2017).

İlk olarak 1913'te izole edilen, başta *Parmotrema tinctorum* olmak üzere *Usnea subvacata*, *Parmotrema stuppuem* ve *Parmotrema grayana* gibi çeşitli kaynaklar tarafından üretilen bir orcinol depsid olan lekanorik asit ($C_{16}H_{14}O_7$) (Şekil 23) antioksidan özellik gösteren

lekanorik asit, aynı zamanda antibakteriyel ve antifungal etkiye de sahiptir (Cimmino *et al.* 2019; Molnár & Farkas 2010).



Şekil 23. Lekanorik asidin kimyasal yapısı ve 3D yapısının gösterimi (Anonymous 2021d)

HEp-2 larinks karsinomu, MCF-7 meme karsinomu, 786-0 böbrek karsinomu ve B16-F10 murin melanom ve normal (Burlando *et al.*) hücre hatlarında lekanorik asit ve orselinat türevlerinin antikanser aktivitesi incelenmiş ve sonuç olarak, lekanorik asidin yapısal modifikasyonunun, test edilen türevlerin sitotoksik aktivitesini artırdığı ve lekanorik aside kıyasla bu hücre hatlarına karşı daha düşük IC50 değerlerinde sitotoksikite gösterdiği belirtilmiştir (Bogo *et al.* 2010).

WNT sinyalinin anormallikleri ile ilişkili olan kolon karsinogenezinde β -katenin'in yüksek transkripsiyonel aktivitesinin, hücrelerin hayatta kalmasını, proliferasyonunu ve metastazını indüklediği belirlenmiştir. Bu yüzden WNT sinyalinin engellenmesi kanser çalışmaları için umut verici bir terapötik strateji haline gelmiştir. Ayrıca birkaç çalışmada, liken özütlerinin uygulanmasının kolorektal kanser hücrelerinin çoğalmasını azalttığı ve apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Bunun için Paluszczak ve arkadaşları tarafından 2018 yılında HCT116 ve DLD-1 kolorektal kanser hücre hatlarında liken türevi depsidlerin (atranorin, lekanorik asit, skuamatik asit) ve depsidonların (fizodik asit, salazinik asit) ve bir polikarboksilik yağ asidinin (kaperatik asit) Wnt sinyali üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak lekanorik asidin, HCT116 hücrelerinde β -katenin hedef geninin (*Axin2*) ekspresyonunu hafifçe azalttığı, kaperatik asidin ise her iki hücre hattında *Axin2* ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. Fizodik asidin de DLD-1 hücrelerine kıyasla HCT116 hücrelerinde *Axin2* ekspresyonunu çok daha güçlü bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca fizodik asit ve kaperatik asit, hücre hattında ve zamana bağlı bir şekilde *survivin* ve *MMP7* ekspresyonunu da azaltmıştır (Paluszczak *et al.* 2018).

Amaç

Patofizyolojisinde oksidatif stresin de yer aldığı hepatoselüler karsinoma (HCC), en sık görülen malign tümörlerden biri olup erken tanısı zor olduğundan prognozu kötüdür ve dünya çapında görülme sıklığı açısından altıncı, ölüm nedeni açısından üçüncü sıradadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın verilerine göre dünya genelinde 2020 yılında tahminen 906.000 yeni karaciğer kanseri vakası ve bundan dolayı 830.000 ölüm meydana gelmiştir ve HCC insidansı çarpıcı bir şekilde artmaktadır. Genel olarak tüm hastalarda 5 yıllık sağkalım oranları olmakla birlikte bu oranlar oldukça düşüktür. Ayrıca tedavi yöntemleri açısından kemoterapötik ajanlar yetersiz kalmakta ve bu ajanlara karşı hücreler direnç göstermektedir. Bu yüzden HCC'nin erken tanısı, taraması ve tedavi yöntemleri için yeni temel bilgilerin edinilmesi ve çeşitli stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanser hücrelerinde artan reaktif oksijen türleri (ROS) ile beraber hayatta kalmaları için kanser hücreleri, tiyoredoksin sistem gibi anitoksidan savunma sistemlerinin etkinliğini arttırmaktadır. Karaciğer gibi pek çok kanser türünde bu sistemin üyelerinden olan tiyoredoksin (TXN) ve tiyoredoksin redüktazın (TRXR) hücrelerde yüksek derecede ifade edildiği ve hücrelerin metastaza, anjiyogeneze, apoptoza ve kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirmesine katkı sağladığı kanıtlanmıştır. Hatta kanserin spesifik özelliklerine sunduğu bu katkılardan dolayı erken tanı için TXN ve TRXR yeni birer biyobelirteç olarak kabul görmekte ve buna bağlı olarak bu proteinlerin inhibisyonunu hedefleyen yeni kanser tedavi stratejileri araştırılmaktadır.

Kanser tedavisinde FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan moleküllerin yaklaşık %49'u doğal ürünler ya da doğrudan bunlardan elde edilen ürünlerdir. Bu doğal ürünler arasına girmek üzere araştırılan birçok liken sekonder metabolitinin çeşitli kanser türleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve bu etkilerin hangi hücresel olay temelli gerçekleştiği incelenmektedir. Bu liken sekonder metabolitleri arasında birçok fonksiyonu üstlendiği bilinen evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik asidin sıçan akciğerlerinde mitokondriyal TRXR (TRXR2) aktivitesini *in vitro* olarak inhibe etmesi kanser hücrelerinde artan tiyoredoksin redüktazı da inhibe edebileceğini düşündürmüştür.

Bu tez kapsamında, insan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattı üzerinde liken sekonder metabolitlerinden olan evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik asitlerin *in vitro* antikanser etkilerini belirlemek ve olası etkilerin TRXR enzim hedefli olup olmadığını gen ve protein seviyesinde inceleyerek literatüre yeni bilgiler kazandırmak hedeflenmiştir. Kemoterapötik ajan olarak kullanılabilirliği araştırılan bu liken asitlerinin (vulpinik ve evernik asit hariç) HepG2 kanser hücre hattında antikanser etkisinin var olup olmadığının saptanmamış olması ve

bu liken asitlerinin HepG2 hücrelerinde TRXR enzim üzerindeki etkilerinin araştırılmamış olması, teze özgün değer katmaktadır.



MATERYAL VE METOT

Kullanılan Kimyasallar

Tablo 1. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

KİMYASAL ADI	ŞİRKET
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma-Aldrich
Akrilamid	Sigma-Aldrich
Amonyum Persülfat	Sigma-Aldrich
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI	Biologend
Antikor (Tiyoredoksin redüktaz)	Santa Cruz Biotech.
Antikor (β -Aktin)	Santa Cruz Biotech.
Bisakrilamid	Sigma-Aldrich
Bromfenol Mavisi	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250 Boyası	Fluka
Difraktaik Asit	TargetMol
Dihidronikotinamid adenin dinükleotit fosfat tetrasodyum tuzu (NADPH)	Sigma-Aldrich
Diklorodifeniltrikloroetan (DTT)	Sigma Aldrich
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco / Sigma-Aldrich
ECL Reagent Substratları	BIORAD
Etanol	Isolab
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
Evernik Asit	Cayman Chemical Company
Fenilmetilsülfonil Flüorid (PMSF)	Sigma Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Sigma-Aldrich
Gliserol	Carlo Erba
Glisin	Sigma Aldrich
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Sigma-Aldrich
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti	Applied Biosystems
Lekanorik Asit	Cayman Chemical Company
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
Metanol	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED)	Santa Cruz Biotech.

Tablo 1. (devamı)

Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich
Polivinilidin Diflorid Membran (PVDF)	Macherey-Nagel
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich
Primerler	Oligomer
Protein Markır	Thermo Fischer
PureLink™ RNA Mini Kit	Invitrogen
RIPA Buffer	Cell Signaling Technology
Sekonder Antikor	Santa Cruz Biotech.
Sığır Serum Albümin (BSA)	Sigma-Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
SYBR Green Master Miks	Bio-Rad
Tripsin – EDTA	Sigma-Aldrich
Trisma Base	Sigma-Aldrich
Tween-20	Riedel-de Haen
Vulpinik Asit	Cayman Chemical Company
Whatman Blotlama Kâğıdı	Bio-Rad
XTT Cell Proliferation Assay Kit	Roche
Yağsız Süt Tozu (Skim Milk Powder)	Sigma-Aldrich
β-merkaptotanol	Sigma Aldrich

Kullanılan Materyal ve Cihazlar

Tablo 2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyaller

MATERYAL	ŞİRKET / MARKA
1 mL'lik Kuvarz Küvetler	Merck
1,5-2 mL'lik Tüpler ve Raklar	Eppendorf
10, 200 ve 1000 µL'lik Pipet Uçları	Isolab
15 ve 50 mL'lik Falkon Tüpler	Labsolute
2, 5, 10 ve 25 mL'lik Serolojik Pipetler	Labsolute
4'lü Strip Tüpler	Qiagen
6'lı ve 96'lı Kuyucuklu Plaka	Labsolute/Corning
Hemositometre Lamı	Marienefeld
Kazıyıcılar (Cell Scraper)	Labsolute
Kriyo Tüp	Clearline ^R
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific™
PCR Tüpleri	Isolab

Tablo 2. (devamı)

Petri Kapları	Corning
T-25 ve T-75 Flasklar	Isolab

Tablo 3. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar

CİHAZ ADI	ŞİRKET / MARKA
Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	Bio-Rad TransBlot ^R Turbo TM Transfer System
Buzdolabı	Arçelik
ChemiDoc TM Touch Imaging System	Bio-Rad
Çeker Ocak	Tolkim
Derin Dondurucu (-20°C)	Profilo
Derin Dondurucu (-80°C)	Nuaire
Distile Su Üretme Cihazı	Milipore Direct-Q8UV
Elektroforez Cihazı	Bio-Rad PowerPac Universal
Etüv	Memmert
Flow (Akım) Sitometri	Beckman Coulter CytoFLEX
Hassas Terazı	Shimadzu
Isıtma Bloku	VWR Digital Heatblock
İnkübatör	Nuaire
İnvert Mikroskop	Zeis
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Mikroplate Okuyucu Spektrofotometre	Epoch Mikroplaka Spektrofotometresi
Mini Santrifüj	IKA miniG
Nanodrop	Therma Scientific Multiscan GO
Otoklav Cihazı	Hirayama
PCR	Bio-Rad C1000 Thermal Cyclers
pH Metre	Mettler Toledo
Real Time PCR Cihazı	Qiagen
Santrifüj	Hettich
Sıvı Azot Tankı	Taylor-Wharton LS750
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter
Sonikatör	Isolab
Steril Kabin	ESCO Class II BSC
Su Banyosu	Memmert
UV- VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter
Vorteks	Heidolph

Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Tablo 4. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

ÇÖZELTİ ADI	HAZIRLANIŞI
1. Komplet DMEM Besiyeri	Hazırlanacak medium miktarının %10'u kadar FBS, %1'i kadar penisilin/streptomisin ve %1'i kadar L-Glutamin bazal DMEM besiyeri içerisine eklenerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
2. Freezing Besiyeri	Komplet DMEM besiyerine %5 oranında DMSO eklenmesi ile hazırlandı.
3. XTT Solüsyonu	Karanlık ortamda kit içerisinde bulunan her 5 mL XTT için 100 µL aktivatörün ilave edilmesi ile kullanılacak olan XTT solüsyon miktarına göre taze olarak hazırlandı.
4. Lizis Tamponu (RNA izolasyonu için)	Kullanılacak olan her bir 1 mL lizis tamponu için kit içeriğindeki lizis (lysis) buffer içerisine 10 µL β-merkaptoetanolün eklenmesi ile hazırlandı.
5. RIPA Buffer (Hücrelerden total proteinin ekstrakte edilmesi için)	ddH ₂ O ile 1:10 oranında seyreltilen RIPA tamponu içerisine 1 mM PMSF içerecek şekilde PMSF eklenip vortekslenerek hazırlandı.
6. Bradford Çözeltisi (Commassie Brilliant Blue)	Alüminyum folyo ile sarılı cam şişede 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi üzerine 50 mL %95'lik etanol ilave edilerek birkaç saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla boya çözündürüldü. Ardından üzerine 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edilerek son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.
7. 5X 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) brom fenol mavisi içerecek şekilde tampon hazırlandı: 2,5 mL Tris/HCl çözeltisi içerisinde 0,771 g DTT, 0,05 g brom fenol mavisi, 5 mL %50 gliserol, 1 g SDS çözündürüldükten sonra distile su ile toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı. Alikuatlanarak -20°C'de saklandı.
8. 1 M Tris/HCl	900 mL distile su içerisinde 121,14 g Tris çözündürülerek 1 M HCl ile pH:6,8'e ayarlanıp toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
9. 1,5 M Tris/HCl	900 mL distile su içerisinde 181,7 g Tris çözündürüldü ve 1 M HCl ile pH:8,8'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1 L'ye tamamlandı.
10. 10XTBS Çözeltisi	900 mL distile su içerisinde 80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris çözündürülerek 1 M HCl ile pH:7,4'e ayarlanıp son hacim distile suyla 1 L'ye tamamlandı ve otoklavlandı.

Tablo 4. (devamı)

11. 10XTransfer Çözeltisi	900 mL distile suda 29 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS çözdürüldükten sonra pH:8,3'e ayarlandı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
12. 1XTransfer Çözeltisi	10XTransfer çözeltisinden 100 mL alınarak üzerine 700 mL distile su ve 200 mL metanol ilave edildi.
13. 10xTris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	30,2 g Tris, 188 g Glisin, 100 mL %10 SDS 1 L distile suda çözdürülerek hazırlandı.
14. 1XTBST Çözeltisi	10XTBS çözeltisinden 100 mL alınıp 900 mL distile suyla 1 L'ye tamamlandıktan sonra içerisine 1 mL Tween-20 ilave edilir.
15. %30'luk Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi	37,5 g akrilamid, 1 g bisakrilamid, 128 mL dH ₂ O 37°C'de karıştırılarak çözdürüldü.
16. %10'luk SDS	9 mL distile su içerisinde 1 g SDS çözdürüldü.
17. %10'luk APS	2 mL'lik çözelti için 1,8 mL dH ₂ O'da 0,2 g APS çözdürüldü.
18. %5'lik Bloklama Çözeltisi	95 mL 1XTBST çözeltisi içerisinde 5 g Yağsız Süt Tozu çözdürüldü.
19. 10 mM K-fosfat (pH:7) / 10 mM EDTA tamponu	Tartılan 6,8 g KH ₂ PO ₄ ve 0,374 g EDTA 90 mL distile su içerisinde çözdürülerek pH:7'ye ayarlandı. Toplam son hacim distile suyla 100 mL'ye tamamlandı.
20. 0,02 mM NADPH Çözeltisi	0,0166 g NADPH distile suda çözdürüldü ve hacim 5 mL'ye tamamlandı.
21. 0,2 mg/mL Sığır Serum Albumin (BSA) Çözeltisi	2 mg BSA son hacim 10 mL olacak şekilde distile su içerisinde çözdürüldü.
22. 5 mM DTNB Çözeltisi	0,01982 g DTNB 10 mL %98'lik etanolde çözdürüldü.

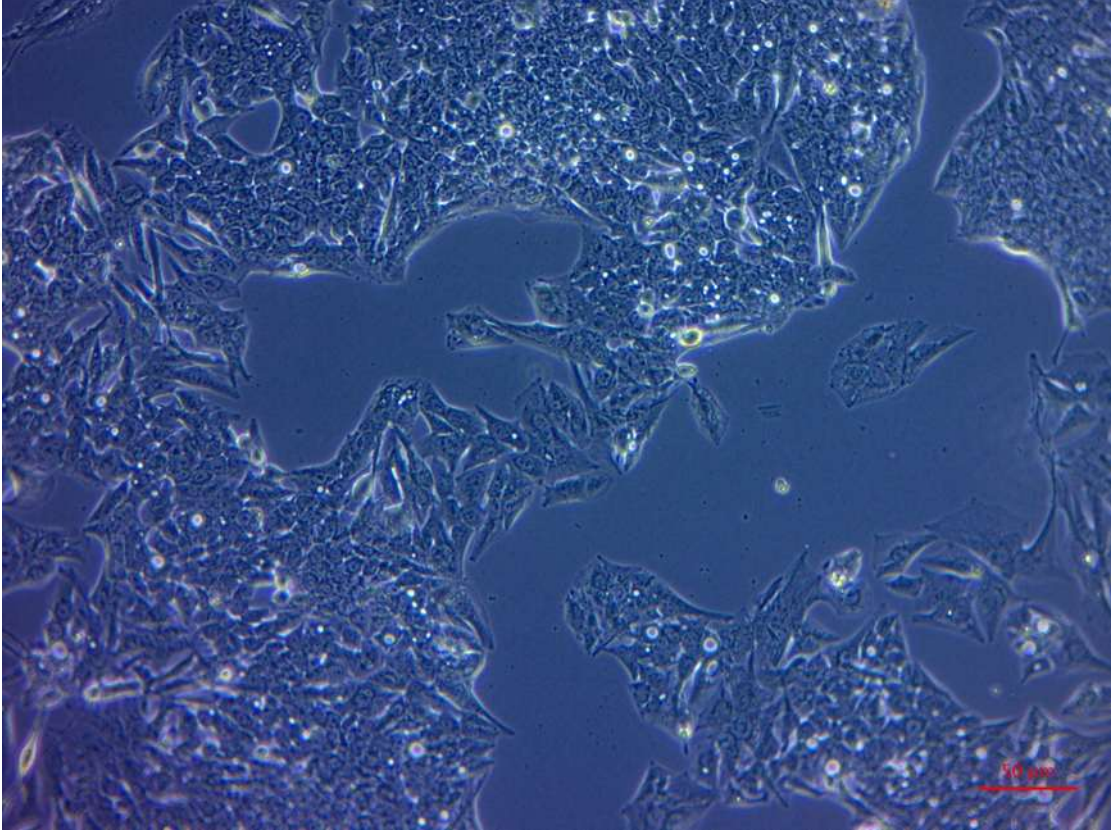
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanseri Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Muamelesi ve Antikanser Etkisinin İncelenmesi

Liken asitlerinin hazırlanması

Ticari olarak satın alınan katı toz halindeki evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik asitlerinin her birinden 5 mg tartılarak son konsantrasyon 25 mg/mL olacak şekilde 200 µL dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. DMSO kullanılmadan önce içerisinde 5 dakika boyunca azot gazı geçirilerek içerisinde çözünmüş olan oksijen gazı uzaklaştırıldı. Ardından vortekslenip iyice çözünmesi için +4°C'de sonikatörde 10 dk boyunca bekletildi ve 20 µL hacimlerde ependorflar içerisinde alikuatlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

HepG2 kanser hücrelerinin kültüre edilmesi

Bu tez çalışması esnasında, insan karaciğer (HepG2) hücre hattı kullanıldı (Şekil 24). Hücreler %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan komplet Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri içerisinde T-25 ve T-75 flasklarda 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücre yoğunluğuna ve deneysel amaca bağlı olarak flask yüzeyi %70-80 doluluğa ulaşıncaya kadar her 2-3 günde bir, hücrelerin besiyeri değiştirildi.



Şekil 24. İnsan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattının mikroskop görüntüsü (Ölçek çubuğu: 50 µm)

Kuyucuklu plaklara ekim yapmak, hücreleri çoğaltmak amacıyla flasklara aktarmak ve hücreleri dondurmak için flasklardan ilk önce besiyerleri uzaklaştırılarak DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkama yapıldı ve ardından tripsin – EDTA (0.25) eklenerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 3-5 dk inkübe edilerek hücreler flask yüzeyinden kaldırıldı. Ardından kullanılan tripsin – EDTA miktarının en az üç katı kadar komplet DMEM besiyeri eklenerek tripsinin etkinliği inhibe edildi ve toplanan hücreler 15 ya da 50 mL'lik steril falkonlarda 1.300 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj cihazında çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler, hangi amaçla kaldırılmışsa ona uygun miktarlarda komplet DMEM besiyeri içerisinde çözündürüldü.

Dondurulacak hücreler flasklardan kaldırılarak %5 oranında DMSO içeren komplet DMEM besiyeri ile hazırlanan freezing besiyeri içerisine alınarak kriyo tüplere aktarıldı ve -20°C’de Mr. Frosty™ Freezing Container’da 50-90 dk boyunca bekletildikten sonra -80°C’de saklandı. Ardından sıvı azot tankına aktarıldı (Cheng *et al.* 2016; Zheng *et al.* 2018).

Hücre proliferasyonu testi

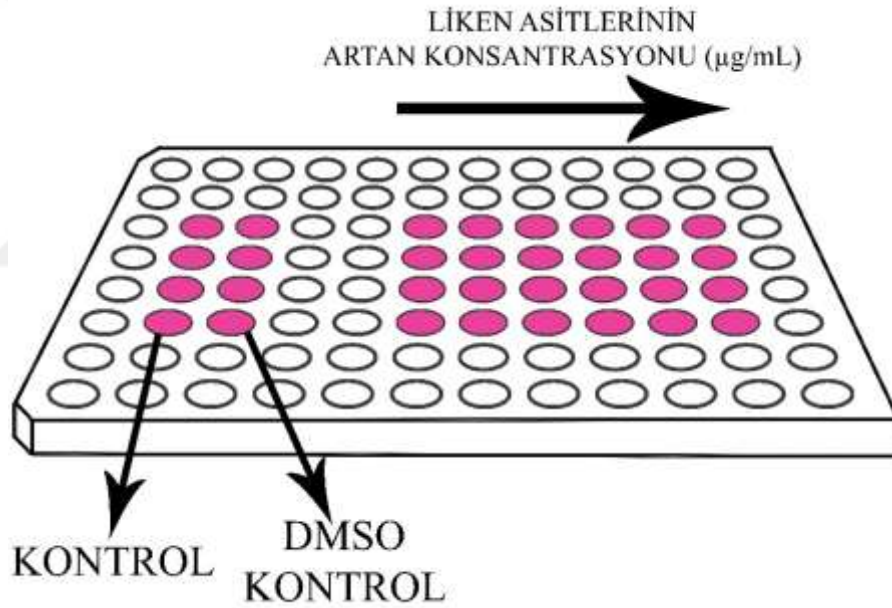
XTT tuzu [(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)] veya formazan boyalarının varlığına bağlı olarak ELISA okuyucuda ya da spektrofotometrede dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçümü ile hücrelerin çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntem olan XTT analizinde, proliferasyon arttıkça artan hücre popülasyonu ile birlikte artan dehidrogenaz aktivitesine bağlı olarak XTT tuzu hücreler tarafından kullanılmakta ve suda çözünebilen formazan denilen turuncu renkli bir boyaya dönüşmektedir (Atmaca *et al.* 2016). Tez kapsamında kullanılacak olan liken asitlerinin (evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik asit) HepG2 hücreleri üzerinde ortaya koyacağı hücre proliferasyon değişimleri, XTT yöntemi ile saptandı ve bu süreçte aşağıdaki protokol izlendi.

1. Flaskta %70-80 doluluk oranına ulaşmış HepG2 hücreleri kaldırılarak hemositometre lamı ile sayımı yapıldı. Daha sonra 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 200 µL kültür besiyeri içerisinde 10.000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Hücrelerin plak kuyucuklarının yüzeyine tutunmaları için 37°C ve %5 CO₂’e ayarlı inkübatörde bir gece bekletildi.
2. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki kültür besiyeri uzaklaştırılarak 100 µL DPBS tamponu ile her bir kuyucuk yıkandı.
3. Farklı konsantrasyonlarda (10-250 µg/mL) olacak şekilde komplet DMEM besiyeri ortamında hazırlanan evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik asitlerinin her bir dozu 96’lık plak kuyucuklarına 100 µL 3-4 tekerrür olacak şekilde uygulandı (Şekil 25). Kontrol grubu olarak da sadece komplet DMEM besiyerinden 100 µL ve pozitif kontrol olarak %1 DMSO içeren komplet DMEM besiyerinden 100 µL ilave edildi. Ardından zaman bağımlı olarak 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildi.
4. İnkübasyon sürelerinden sonra kuyucuklarda bulunan kontrol grupları ve ilaç doz uygulamaları uzaklaştırılarak her kuyucuk 100 µL DPBS tamponu ile yıkandı. Ardından kuyucukların her birine 100 µL taze komplet DMEM besiyerinden konulduktan sonra her bir kuyucuğa 50’şer µL hazırlanan XTT solüsyonundan ilave edildi. Plaklar alüminyum folyoya sarılı bir şekilde 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde 7 saat boyunca inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğun absorbansı, mikropate okuyucu spektrofotometre ile 470 nm’de ölçüldü.
6. Her bir liken asidinin hücre proliferasyonunu %50 azaltmak için gereken ilaç konsantrasyonunu ifade eden IC₅₀ değerleri, absorbans sonuçlarına göre GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software, San Diego, CA) istatistik programı ile hesaplandı. Hücre proliferasyonundaki azalış ise aşağıda belirtilen formülle saptandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{[\text{Abs}(\text{liken asidi ile muamele edilen hücreler}) - \text{Abs}(\text{hücresiz ortamdaki liken asidi})]}{[\text{Abs}(\text{kontrol grubu hücreler}) - \text{Abs}(\text{hücresiz ortam})]} \times 100$$

Hesaplanan bu konsantrasyon ve inkübasyon süresi, daha sonraki deneysel süreçlerde HepG2 hücrelerine liken asitlerinin muamele edilmeleri sırasında kullanıldı (Atmaca *et al.* 2016).



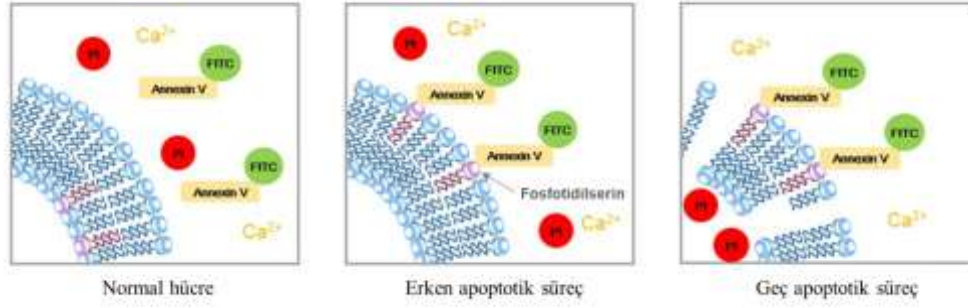
Şekil 25. XTT testi için 96 kuyucuklu plakadaki hücrelere kontrol ve liken asitlerinin muamele edilme prosedürü.

XTT analizi yapılırken 96 kuyucuklu plakaya ekimi yapılacak hücre sayısı ve XTT solüsyonunun inkübasyon süresi optimize edildi. Hücre sayısının optimizasyon basamağında bir plakaya 4 tekerrür olacak şekilde kuyucuklara sırasıyla 2.500 – 5.000 – 7.500 – 10.000 hücre ekimi yapıldı. Daha sonra yüzeye tutunan hücrelere herhangi bir liken asidi uygulanmadan sadece komplet DMEM besiyeri verilerek yukarıda belirtilen protokol gerçekleştirildi. Protokolde XTT solüsyonunun uygulanmasının ardından hücrelerin 37°C’deki inkübasyon süresini belirlemek için de 4. saatten başlayarak her saatte bir mikropate okuyucu spektrofotometre ile 470 nm’de absorbans ölçümü alındı. Bu sonuçlara göre, kuyucukların

kendi tekerrürleri arasında absorbans değerlerinin, hangi hücre sayısında ve inkübasyon süresinde 1,0 ve üzerinde sabitlendiği belirlendi. Sonuç olarak bunun sonucunda liken asitlerinin uygulamasının yapıldığı ana deneysel süreçlerde her kuyucuğa 10.000 hücre ekimi yapıldı ve XTT solüsyonu 7 saat inkübe edildi.

Apoptoz testi

Liken asitleri ile muamele edilen hücrelerde ortaya çıkabilecek olan apoptotik ve nekrotik olaylar, Annexin V FITC-PI kiti kullanılarak belirlendi. Sağlıklı hücrelerde hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzeyinde yer alan fosfatidilserin, hücrelerin apoptotik sürece girmesi ile birlikte hücre zarının dış yüzeyine transloke olurlar. Kit içeriğinde bulunan Annexin V boyası, bu transloke olan fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlarken bu boyanın nekrotik hücrelere de bağlanma olasılığı olduğundan tek başına apoptotik ve nekrotik hücreleri birbirinden ayırt edemez. Bu sorun, kit içeriğindeki ikinci bir boya olan propidyum iyodürün (PI) sadece nekrotik hücrelerden hücre içeriğinin sızması sonucu açığa çıkan DNA'yı boyaması ile ortadan kalkmaktadır. Böylece hücrelerin apoptoz mu ya da nekroz mu geçirdiği saptanmış olur. Apoptoz ya da nekroz geçirmeyen sağlıklı hücrelere ise Annexin V ve PI nüfuz edemediğinden boyanmazlar (Annexin V ve PI ile negatif boyama) ve bu durum hücrelerin canlı (vital) olduğunun bir göstergesidir. Erken apoptoz evresinde ise sadece fosfatidilserinin transloke olma durumu söz konusu olduğundan erken apoptotik süreçte olan hücrelerin Annexin V ile pozitif ve PI ile negatif boyama göstermesi beklenir. Apoptotik süreç devam edip geç apoptotik sürece geçildiğinde de hücrelerde nükleer yoğunlaşma, hücre büzülmesi ve plazma zarının bütünlüğünün kaybı meydana gelir. Bunun sonucunda ise PI hücrelere girerek DNA'ya bağlanır ve böylece geç apoptotik hücreler, hem Annexin V hem de PI ile pozitif boyama göstererek diğer hücrelerden ayırt edilmiş olunur. Annexin V ile negatif ve PI ile pozitif boyanması durumu ise hücrelerin nekroz geçirdiğini gösterir (Şekil 26) (Arumugam *et al.* 2019; Vermes *et al.* 1995). Kite belirtilen ve uygulanan aşağıdaki talimatlar doğrultusunda liken asitleri ile muamele edilmiş olan ve kontrol grubundaki HepG2 kanser hücreleri, Annexin V ve PI boya ile boyanarak flow (akım) sitometresi ile hücrelerin hangi oranda apoptoza ve nekroza gittiği tespit edildi.



Şekil 26. Annexin V FITC / PI kit içeriğindeki boyaların çalışma prensibi (Anonymous 2021e)

Kontrol ve liken asitleri ile muamele grupları için ikişer tekerrür olacak şekilde 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna ikişer mL sayımı yapılan hücrelerden (150.000 hücre/mL) ekilerek yapışmaları için plakalar 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde %60-70 doluluğa ulaşana kadar bekletildi. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırılarak, kuyucuklar DPBS tamponu ile yıkandı. Hücrelere muamele edilecek liken asitleri komplet DMEM besiyeri içerisinde hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonlarında hazırlanarak 24 saatlik muamele için 1,5 mL; 48 saatlik muameleler için 2 mL olacak şekilde kuyucuklara eklendi. 24 ve 48 saatlik kontrol grubundaki hücrelere sırasıyla %0,1 ve %0,5 DMSO içeren komplet DMEM besiyeri, pozitif kontrol grubundaki hücrelere ise sırasıyla 1.000 ve 750 µM konsantrasyonlarında hidrojen peroksit (H₂O₂) ile hazırlanan komplet DMEM besiyeri verildi. Ardından plakalar 37°C de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde liken asitlerinin hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre evernik asit ile yapılan muamele ve kontrol grupları 24 saat, vulpinik ve difraktaik asit ile yapılan muamele ve kontrol grupları ise 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinden sonra hücreler aşağıda verilen Annexin-V- FITC-PI Boyama kiti protokolüne göre deney gerçekleştirildi ve flow sitometri cihazı kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesi belirlendi.

1. Kontrol ve her muamele gruplarındaki besiyerleri falkon tüplere alındı.
2. Kuyucuklar 0,5 mL DPBS ile yıkanarak DPBS de falkonlara aktarıldı.
3. Her bir kuyucuğa 0,5 mL tripsin – EDTA eklenerek 37°C ve %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde 3-5 dk inkübe edildi ve hücreler kuyucukların yüzeyinden ayrıldıktan sonra 1,5 mL komplet DMEM besiyeri eklenip hücreler falkona toplandı.
4. 1.300 rpm’de 5 dk boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı.
5. Her bir falkona 0,5 mL soğuk DPBS tamponu eklenerek hücrelere zarar vermeden nazikçe pipetaj yapıldı. Ardından 1.300 rpm’de 5 dk boyunca santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı.
6. İki kez DPBS ile yıkama yapmak için 5. maddedeki işlemler tekrar edildi.

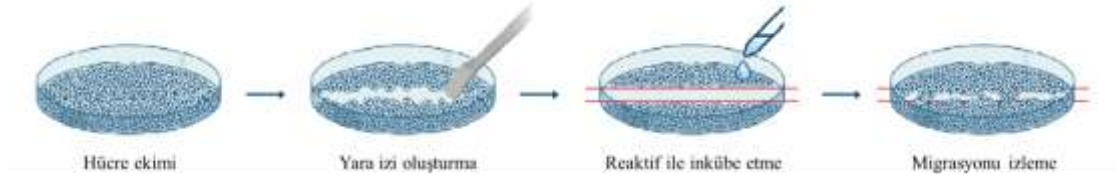
7. Daha sonra her bir falkona 100 μ L Annexin V Binding Buffer eklenerek pelet çözdürüldü.
8. Karanlık ortamda her bir falkona 2,5 μ L Annexin V-FITC ve 5 μ L Propidium iodide (PI) boyası eklenerek nazıkçe pipetaj yapıldı ve 15 dk boyunca inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrasında her bir falkona 400 μ L Annexin V Binding Buffer eklenerek flow sitometri cihazı kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesi belirlendi.

Flow sitometri cihazı ile yapılan çalışmalarda kullanılacak olan flourokromların verdikleri sinyaller, cihazdaki filtrelele rağmen tam kesin sınırlarla birbirlerinden ayrılmayabilir ve bu durumdan dolayı floresan sinyallerin bazı dalga boylarında üst üste binmesine (overlap) bağlı olarak hatalı değerlendirmeler yapılabilir. Bu problemi çözmek için “kompanzasyon” (çıkarmalar) denilen bir işlemin uygulanması gerekir. Bu işlem ile cihazdaki detektöre gelen çakışan kısmı ifade eden yabancı sinyalin, orijinal sinyalden çıkarılmasıyla daha temiz ve doğru bir analiz yapılması sağlanır (Bagwell & Adams 1993). Apoptoz deneyi sürecinde de HepG2 hücrelerinin ve kit içeriğindeki floresanların yabancı sinyal vermesine karşın asıl apoptoz deneyinden önce kompanzasyon işlemi gerçekleştirildi. Bunun için HepG2 hücreleri ile Annexin V-FITC ve PI florokromlarıyla boyama yapılmayan bir negatif ve Annexin V-FITC ve PI florokromlarının her biri için ayrı ayrı tüplerde olmak üzere birer pozitif sinyal kaynağı oluşturuldu. Seçilen pozitif sinyal kaynağının sadece kendi floresan kanalında pozitif, diğerlerinde ise negatif olması beklenir. Buna bağlı olarak CytExpert Software programında grafikler aracılığıyla floresan kanalından negatif alana ne kadar taşıdığı tespit edildi ve gerekli kompanzasyon yapılarak negatif olması gereken alanların temizlenmesi sağlandı.

Migrasyon testi

Tez kapsamında yapılacak olan diğer tüm deneylerde kontrol ve muamele grubu olmak üzere iki grup yer almaktadır. Yapılan XTT testi sonucunda her bir liken asidi (evernik, vulpinik ve difraktaik asit) için hesaplanan IC₅₀ konsantrasyon dozlarında komplet DMEM besiyerinde hazırlanan liken asitleri ile uygulama yapılan HepG2 kanser hücre hatları, muamele grupları olarak adlandırılacaktır. Herhangi bir liken asidiyle muamele edilmemiş sadece komplet DMEM besiyeri verilen HepG2 kanser hücre hattı ise kontrol grubu olarak adlandırılacaktır.

Yara iyileştirme (wound healing assay) testinin temeli hücrelerin plakalarda ya da petri kaplarında tek tabaka halinde tüm yüzeyi kaplayıp büyüyen hücrelere çizik atılmasının (yara oluşturmasının) ardından uygun büyüme koşullarında inkübe edilerek belirli saat aralıklarıyla mikroskop görüntüsü alınması ve ImageJ gibi software programlar ile alan hesaplaması yapıp yaranın ne kadar kapandığı belirlenerek hücrelerin migrasyon etkinliğini ölçmeye dayanmaktadır (Şekil 27) (Hulkower & Herber 2011).



Şekil 27. Yara iyileştirme (wound healing assay) testinin prosedürü (Anonymous 2021f)

Liken asitlerinin HepG2 kanser hücreleri üzerinde migrasyonu engelleyici etkisinin var olup olmadığını belirlemek için de yara iyileştirme testi (wound healing assay) ile aşağıdaki prosedür izlenerek migrasyon testi gerçekleştirildi.

1. 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna sayımı yapılan hücrelerden ikişer mL olarak (500.000 hücre/mL) ekim yapıldı ve hücrelerin yüzeye yapışmaları için 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde %90 doluluğa ulaşana kadar inkübe edildi.
2. Daha sonra 10 µL’lik pipet uçları yardımı ile her bir kuyucuk içerisindeki hücrelere çizikler atılarak besiyeri uzaklaştırıldı.
3. Ardından iki kez DPBS tamponu ile yıkama yapılarak komplet DMEM besiyerinde hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonlarında hazırlanan muamele grupları ve sadece komplet DMEM besiyeri içeren kontrol grubu dörder tekerrür olacak şekilde kuyucuklara uygulandı.
4. Hücreler 37°C de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek 0, 12, 24, 48 ve 72 saatlerdeki görüntüleri invert mikroskop kullanılarak alındı.
5. ImageJ software programı yardımıyla alan hesaplaması yapılarak liken asitlerinin migrasyona etkileri belirlendi ve aşağıda belirtilen formülle yara alan yüzdeleri hesaplanarak GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software, San Diego, CA) istatistik programı kullanılarak değerlendirildi ve Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. p>0,05 = ns önemsiz (bir farkın olmadığı), *p<0,05 önemli, **p<0,01 çok önemli, ***p<0,0005 ve ****p<0,0001 yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi (Bobadilla *et al.* 2019).

$$\hat{A}(t)=A(t)/A(0)\times 100$$

$\hat{A}(t)$: Yara alanı yüzdesi

$A(t)$: t zamanındaki yara alanı

$A(0)$: 0. saatteki başlangıç alanı

İnsan Karaciğer (HepG2) Kanseri Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Muamelesinin Ardından Tioredoksin Sistem Üyelerinden TXN ve TRXR1 ve Apoptotik Yolak Genlerinden BAX, BCL2, P53 için Ekspresyon Analizi

mRNA izolasyonu

Her bir kuyucuğa ikişer mL olarak (150.000 hücre/mL) sayımı yapılan hücrelerden 6 kuyucuklu plakaya ekim yapıldı. Ardından plakalar %60-70 doluluğa ulaşana kadar 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırılarak DPBS tampon ile yıkandı. Her bir muamele ve kontrol grubu ikişer-üçer tekerrür olacak şekilde kuyucuklara sırasıyla komplet DMEM besiyerinde hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonlarında hazırlanan liken asitleri ve sadece komplet DMEM besiyeri eklenerek hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre 24 ve 48 saat boyunca 37°C de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin ardından besiyeri uzaklaştırılıp DPBS tampon ile yıkama yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 600 µL kadar lizis tamponu (her bir 1 mL lizis tamponu için 10 µL β-merkaptoetanol) ilave edilerek yüzeydeki hücreler kuyucuklardan 1,5 mL’lik ependorflara toplandı. Daha sonra aşağıda belirtilen PureLink™ RNA Mini Kit protokolüne göre RNA izolasyonu yapıldı.

1. Lizis tamponu eklenip daha sonra ependorflara toplanan hücreler vorteksenerek 12.000 g’de oda sıcaklığında 2 dk santrifüjlendi.
2. Her bir süpernatant RNase free tüplerine aktarılıp üzerlerine süpernatant ile 1:1 oranında olacak şekilde yani 600 µL kadar %70’lik etanol ilave edilerek vortekslendi.
3. Daha sonra süpernatant ve etanol karışımından Codrige tüplere (spin kolona) 700 µL kadar eklendi.
4. 12.000 g’de oda sıcaklığında 15 sn santrifüj yapılmasının ardından kolonların altında kalan sıvı uzaklaştırılarak geriye kalan 500 µL kadar süpernatant + etanol karışımı da kolonlara eklendi ve 12.000 g’de oda sıcaklığında 15 sn santrifüj yapıldı. Daha sonra kolonların altında kalan sıvı tekrar uzaklaştırıldı.
5. Kit içeriğinde bulunan 700 µL Yıkama Tamponu I kolonlara eklenerek 12.000 g’de oda sıcaklığında 15 sn santrifüj yapıldı. Kolonlar, çıkartılarak çöken sıvı ile birlikte tüp atıldı ve ardından yeni bir toplama tüpü içine yerleştirildi.
6. Bu basamak 2 kez yapılmak üzere kolonlara 500 µL Yıkama Tamponu II eklenerek 12.000 g’de oda sıcaklığında 15 sn santrifüj yapıldı ve kolonların altında kalan sıvı uzaklaştırıldı.

7. Kolonlara herhangi bir madde eklemesi yapılmadan boş bir şekilde 12.000 g'de oda sıcaklığında 2 dk santrifüj yapıldı ve ardından kolonların yerleştirildiği toplama tüpleri atıldı.
8. Daha sonra kolonlar 1,5 mL'lik ependorflar içine yerleştirilerek her birine 50 µL RNase içermeyen su ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
9. Ardından 13.000 g'de oda sıcaklığında 2 dk santrifülenerek kolonlardan RNA'ların ependorflara geçmesi sağlanarak RNA izole edildi ve RNA konsantrasyonları ve saflıkları nanodrop ile belirlenerek -80 °C'de RNA örnekleri muhafaza edildi.

Nükleik asitlerin kantitatif tayinleri, bünyesinde barındırdıkları tüm pürin ve pirimidin bazlarının kuvvetli bir şekilde 260-280 nm'de UV ışığını absorbe etmelerinden dolayı spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmektedir. İzole edilen nükleik asit ortamında protein kirliliğinin olup olmadığı ise 280 nm'de absorbans ölçümü yapılarak tespit edilmektedir. Saf olarak elde edilen yani herhangi bir protein kirliliği taşımayan DNA örneklerinde A260/A280 oranı yaklaşık olarak 1,8 iken RNA örneklerinde ise A260/A280 oranı yaklaşık olarak 2,0'dir. Bu oranların altında kalan değerler, ortamda proteinlerin ve izolasyon esnasında kullanılan fenolün oluşturduğu bir kirliliğin mevcut olduğunu gösterir. Deney sonunda izole edilen RNA örneklerinin spektroskopik ölçümü sonucunda A260/A280 oranlarının 2,0-2,1 arasında olduğu belirlendi (Tablo 16).

cDNA sentezi

cDNA sentezini yapmadan önce izole edilen mRNA örneklerinin konsantrasyonları 10 µL total hacimde olacak şekilde eşitlendikten sonra High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği aşağıdaki protokole göre cDNA sentezi yapıldı (Zhang *et al.* 2018).

Kit içeriğinde bulunan bileşenler buz üzerinde çözündürüldü. Daha sonra her bir RNA örneği için PCR tüplerine 10'ar µL dağıtılmak üzere, steril bir mikrosantrifüj tüpünde Tablo 5'te belirtilen hacimlerde kit bileşenlerinin ilavesi ile bir ön karışım hazırlandı. PCR tüplerinin her birine konsantrasyonları eşitlenen kontrol ve muamele gruplarının RNA'larından 10'ar µL eklenerek üzerlerine hazırlanan ön karışımdan 10'ar µL ilave edildi ve böylece son hacim 20 µL'ye tamamlanmış oldu.

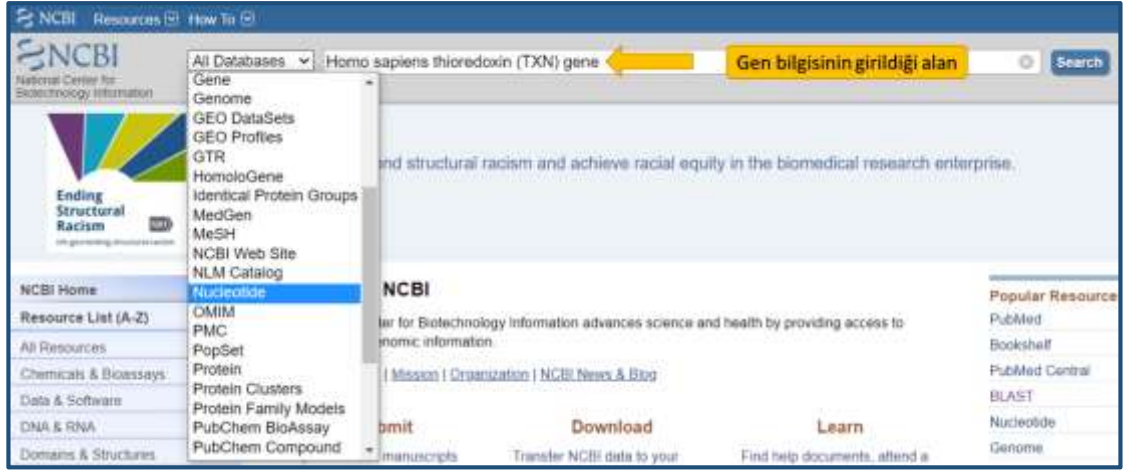
Tablo 5. cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri ve Hacimsel Miktarları

Bileşen	Hacim (µl)
10XRT Buffer	2
25XdNTP Mix (100mM)	0,8
10XRT Random Primer	2
MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1
Nükleaz-içermeyen H ₂ O	4,2
mRNA	10
TOTAL HACİM	20

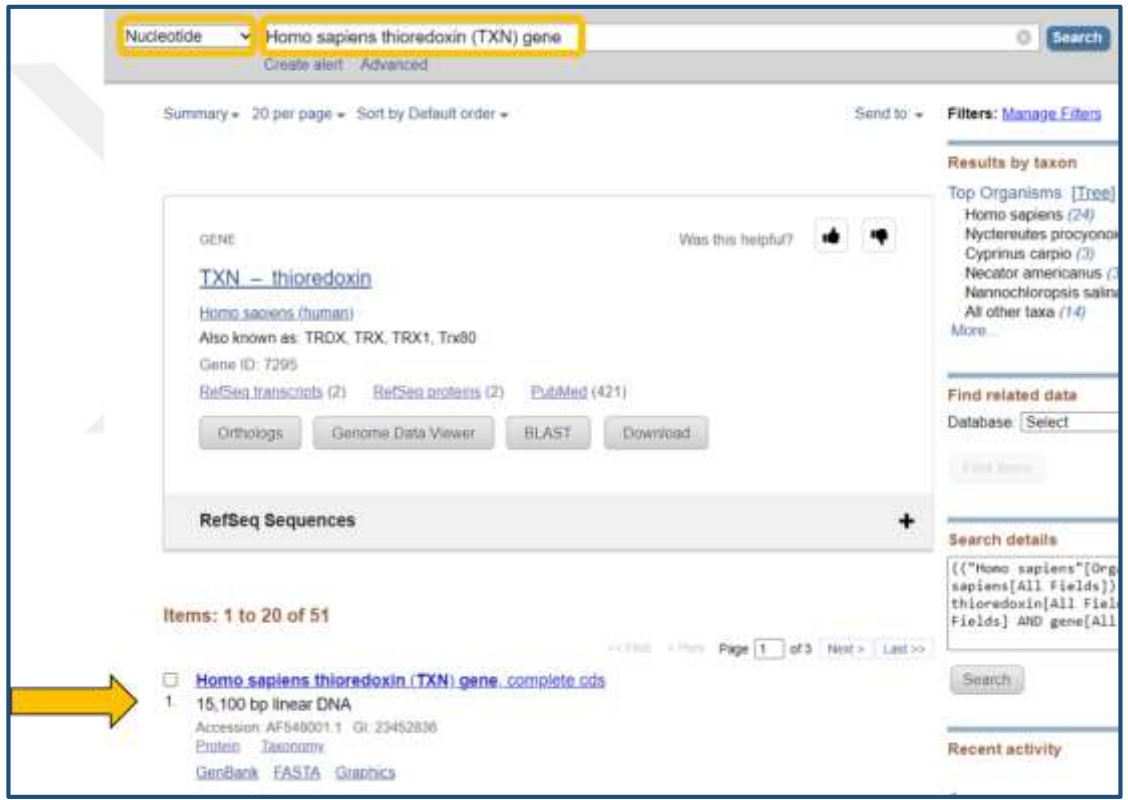
Daha sonra 25°C’de 10 dk; 37°C’de 120 dk; 85°C’de 5 dk ve son olarak 4°C’de ∞ olacak şekilde ayarlanan PCR cihazı kullanılarak RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen her bir cDNA örneğinin konsantrasyonları ve saflıkları nanodrop cihazında spektroskopik olarak ölçülmesinin ardından Real-Time PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C’de saklandı. Sentezlenen cDNA örneklerinin spektroskopik ölçümü sonucunda A260/A280 oranlarının 1,78-1,9 arasında olduğu belirlendi (Tablo 17).

Primer dizaynı

Tez kapsamında ekspresyon profil analizleri yapılacak olan insan tiyoredoksin 1 (TXN), tiyoredoksin redüktaz 1 (TRXR1) genlerinin, apoptotik yolak genlerinin (BAX, BCL2, P53) ve housekeeping olarak beta aktin (β-AKTİN) geninin primer dizaynları <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> programı kullanılarak yapıldı. Bunun için ilk önce ilgili genlerin baz dizilimine ulaşmak için National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazından yararlanıldı. Şekil 28’de gösterildiği gibi NCBI ana sayfasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) “All databases” bölümünden “Nucleotide” seçeneği seçilerek arama motoruna gen bilgisi (kısaca veya uzun adı ya da ID numarası) girip “Search”e tıklanarak arama yapıldı.



Şekil 28. Primer dizaynında gen bilgisine ulaşmak için kullanılan NCBI anasayfası



Şekil 29. Yapılan arama sonucunda açılan gen ile ilgili dizilimlerin verildiği NCBI sayfası

Homo sapiens thioredoxin (TXN) gene, complete cds

GenBank: AF548001.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☐

LOCUS AF548001 15100 bp DNA linear PRI 02-OCT-2002

DEFINITION Homo sapiens thioredoxin (TXN) gene, complete cds.

ACCESSION AF548001

VERSION AF548001.1

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

Şekil 30. İlgili genin nükleotit dizilimine ulaşılacak bağlantı linkinin yer aldığı NCBI sayfasının görüntüsü

Şekil 30’da gösterilen ilgili gene ait nükleotit dizilimine ulaşmak için ‘FASTA’ seçeneğine tıklanarak Şekil 31’deki gibi nükleotit sekansı elde edildi. Daha sonra bu sekanstan <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> web adresi kullanılarak, genlere ait mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla primer dizayn edildi.

Homo sapiens thioredoxin (TXN) gene, complete cds

GenBank: AF548001.1

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

>AF548001.1 Homo sapiens thioredoxin (TXN) gene, complete cds

GTTATAGATTCTGCTCTGGGTGCTCCATACAGCTCCTTCCTCTCTGCCCAATAACCTCCCTCTCTTTGG
GAACATTGCTGCATTGAGGAGCTGTCTTCCCTCCCTATGGGCTGTCTTTAGAATGTGTCCCTTGCCCT
ATATCCATATTCATGCTCCGTGCTCCTCAGCCCCCTAGAACTTTGCACAATAGATTCAAAACCTCTGGT
TTCTCTCCCTCTCTGTCTGAAAGAGTGAAAGAAGGAAGCCAGGGATTTCAGGGGGCAGCCAGGCAGCAG
TATCACCACCCCTAGGCAATCACACCTAGTTGCGAGCTTCATCGGGAACAGCTCAGCTCTGAAAACACAGA
CCTGGGACTCTCCCTCCAGCCTTCTAGCTCTCGTTCCTGTGAGCAGCTTTCAACCTCCACTTCCAGCC
GCTGACAGGCCCTCCTGGCTCCACAAGGCCAGCTAACATACCCACCTTCCACAATCCCAGCCCTGCCAG
ACATAACCTGCAACAGGCATTCTGGATCAATGCAAACTCCGACTTCTGTTCCAGGAGTCTGCCTCTGTT
AGAAGAATCTCACACAAGTGTGCGTGCTGTGCCATTGTAATGCTGTATAAGGTGGCCAGGCCCAATCAG
TCCCTGCAAGACACCGAACAGTAAGAATATCTATGGAGTGTCTTACTATGTGCCAAGCACCCTCTTTC
AAGCACTATTAACCTCAAAATACCACCACCGTGAGATTGAGACCATCATGATTCCTTCTACAGAAAGG
AAACACTGAGACTTTAGGAGGTGAGGACCTTCCAGGGTCACAACCTGCGTAACTAAGTTGCAGAGCTCAA
CCCAGTGGCACTTCCATCTCACACGCAGCTGTCTGATGGTCAAGAGCCCAACAGTCCCCCGGTCTTTTC
TACCGCACTAAACCGCTGTGTCAAGCTGGAGCAGCGGGCTCAGCAGTGAATGAAAGAACAGAAGGAGG
TTACAGAGAAGAGAACGGTCACGGTAAATTCCGGAGAGGAGGCAAGGACGTACACACCGAGATACTTCCC

Şekil 31. Primer dizaynı yapılacak gene ait nükleotit sekansının verildiği internet sayfasının görüntüsü

Primer dizayn ederken aşağıda belirtilen konulara dikkat edildi.

- Left ve right primerlerin bağlanma sıcaklıklarının arasındaki fark en fazla 0,5 kadar olmalıdır.

- Primer sekanslarının adenin veya timin bazları ile başlamalı, guanin veya sitozin bazları ile sonlanmalıdır.
- Primerlerin GC içeriği genellikle %35-65 arasında olmalıdır.
- Primer ve problemlerin kendi aralarında ve kendi kendilerine bağlanma ihtimalleri olabildiğince düşük olması için 4 ve daha fazla baz tekrarlarından kaçınılmalıdır.
- Amplifikasyon bölgesinin boyutu yaklaşık 60-150 bp arasında olmalıdır (Bastem 2017).

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

[Checks for mispriming in template.](#) [disclaimer](#) [Primer3 Home](#)
[Primer3plus interface](#) [cautions](#) [FAQ/WIKI](#)

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNaegtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#):

NONE

TTGAACCAAGAAAGTCTGGTACCAGAATATGTGCCTTTAACTACTACATTGCCCTCAGTGCAACAATCTG
 AGTAAGCAGGAAAATGATGGGCCCTTAGTTGAGTTTCTTCTCATGTGAAATTAGGATGCCAAACTTAG
 ATGATCTCTCAAAATACTAATGGAATGCCCTGTTATGTGCCAGGCATCATGCTAGGCTTGGGATAAAGCTG
 TGAATAAGACACCTCATCTCATAACAGCTTACATTAGAACGAGAGACAACTGGTGAATAATAGACT
 GGTATATTCTACAAGGCAAAACCAAACTGGGCGCAGTAATGAGAAGAAATAGGGGAACCCGCTGTGCAT
 CAGGTGGTTGGACCTGGGTTCTTTGAGGTGACTGTAACAGAGCTGTTGG

☒ Pick left primer, or use left primer below:

☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:

☒ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Şekil 32. Primerin dizayn edildiği veri tabanı

Şekil 32’de gösterildiği gibi ilgili gen dizilimi kutucuğa yapıştırılarak left primer ve right primer kutucukları işaretlendi. Açılan sayfadaki ‘General Primer Picking Conditions’ bölümünde primer dizaynı için gerekli olan amplifikasyon bölgesinin boyutu, primer boyutu, primerin bağlanma sıcaklığı, primer % GC oranı vs. bilgileri Şekil 33’teki gibi ilgili alanlara girildi. Ardından "Pick Primer" sekmesine tıklanarak Şekil 34’te verilen primer dizileri elde edildi.

[Excluded Regions:](#) E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases starting at 68,3 forbids primers in the central CCCC.

[Product Size Ranges:](#) 80-200

[Number To Return:](#) 5 [Max 3' Stability:](#) 9.0

[Max Repeat Mispriming:](#) 12.00 [Pair Max Repeat Mispriming:](#) 24.00

[Max Template Mispriming:](#) 12.00 [Pair Max Template Mispriming:](#) 24.00

General Primer Picking Conditions

[Primer Size:](#) Min: 20 Opt: 20 Max: 22

[Primer Tm:](#) Min: 59 Opt: 60 Max: 60 [Max Tm Difference:](#) 100.0 [Table of thermodynamic parameters:](#)

[Product Tm:](#) Min: Opt: Max:

[Primer GC%:](#) Min: 35.0 Opt: Max: 65.0

[Max Self Complementarity:](#) 3.00 [Max 3' Self Complementarity:](#) 3.00

[Max #N's:](#) 0 [Max Poly-X:](#) 3

[Inside Target Penalty:](#) [Outside Target Penalty:](#) 0 [Note: you can set Inside Target Penalty:](#)

[First Base Index:](#) 1 [CG Clamp:](#) 0

[Concentration of monovalent cations:](#) 50.0 [Salt correction formula:](#) Schildkraut and Lifson 1965 ▾

[Concentration of divalent cations:](#) 0.0 [Concentration of dNTPs:](#) 0.0

[Annealing Oligo Concentration:](#) 50.0 (Not the concentration of oligos in the reaction mix but of those annealing to template)

☒ [Liberal Base](#) ☐ [Show Debugging Info](#) ☒ Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus ☐ [Lowercase masking](#)

Şekil 33. Primer dizaynı için gerekli olan bilgilerin girildiği veritabanındaki ilgili alanlar

Primer3 Output

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	730	20	59.63	50.00	3.00	2.00 CCGTGAGATTGAGACCATCA
RIGHT PRIMER	927	20	59.90	50.00	2.00	2.00 AGCGGTTTAGTGCGGTAGAA

SEQUENCE SIZE: 15100
INCLUDED REGION SIZE: 15100

PRODUCT SIZE: 198, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

```

1 GTTATAGATTCTGCTCTGGGTGCTCCATACAGCTCCTTCTCTCTGCCCAATAACCTCC

61 CTCTCTTTGGGAACATTGCTGCATTCAGGGCAGTCTGTCTTCCCTCCCTATGGGCTGTCT

121 TTAGAATGTGTCCCTTGCCCTATATCCATATTATGCTCCGTGCTCCTCAGCCCCCTAGAA

181 ACTTTGCACAATAGATTCAAAACCTCTGGTTTCTCCCTTCTCTGTCTGAAAGAGTGAA

241 AGAAGGAAGCCAGGGATTTCAGGGGGCAGCCAGGCAGCAGTATCACCACCCTAGGCAAT

301 CACACCTAGTTGCAGCTTCATCGGGAACAGCTCAGCTCTGAAAACACAGACCTGGGACTC

```

Şekil 34. Veritabanı tarafından ilgili gen için önerilen primerlerin nükleotit dizilimlerinin ve özelliklerinin verildiği sayfanın görüntüsü

İlgili gene ait dizayn edilen primerlerin başka genlerle homolojisinin olup olmadığı yani primerlerin bağlanma spesifiklikleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> programı ile Şekil 35'te gösterildiği gibi kontrol edilerek Şekil 36'daki blast sonuçları elde edildi.

Şekil 35. İlgili gene ait primerlerin başka genlerle homolojisinin araştırılacağı Nucleotide BLAST veri tabanı

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Aln. Len	Accession
Homo sapiens, chromosome 11 (291) (Gene: CCR4orf10)	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.022	100.00%	15100	AC154800.1
Homo sapiens, chromosome 11 (291) (Gene: CCR4orf10)	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.022	100.00%	2701	AF084048.1
Homo sapiens, chromosome 11 (291) (Gene: CCR4orf10)	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.022	100.00%	2440	X77086.1
Homo sapiens, chromosome 11 (291) (Gene: CCR4orf10)	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.022	100.00%	41792	AC106483.4
Homo sapiens, chromosome 11 (291) (Gene: CCR4orf10)	Homo sapiens	40.1	70.4	100%	0.022	100.00%	194835	AL158156.14
Homo sapiens, chromosome 11 (291) (Gene: CCR4orf10)	Homo sapiens	36.2	96.6	98%	0.34	100.00%	807558	NL_004187.2
Homo sapiens, chromosome 11 (291) (Gene: CCR4orf10)	Homo sapiens	36.2	32228	100%	0.34	100.00%	84278897	CP068261.2

Şekil 36. İlgili gene ait primerlerin başka genlerle homolojisinin gösterildiği blast sonuçları

Real-Time PCR deneyinde kullanılmak üzere dizayn edilen primerler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Gen Ekspresyon Profillerine Bakılan Genler için Dizayn Edilen Primerlerin Listesi

Gen Adı	Accession No	Primer	Primer Dizisi (5' → 3')	Tm (°C)	%GC Oranı
TXN	AF548001.1	Left	CCGTGAGATTGAGACCATCA	59.63	50.00
		Right	AGCGGTTTAGTGCGGTAGAA	59.90	50.00
TRXR1	DQ157758.1	Left	TTTGGTAAACGGATGGCTTC	59.94	45.00
		Right	AGGAAAGAACACGGGACAGA	59.70	50.00
BAX	AY217036.1	Left	CAGGAAGTGGAAGGTGGAG	59.69	55.00
		Right	CTCAGGATGAAGACCCGAAG	59.80	55.00
BCL2	XM_011526135.3	Left	TTGTAGTGTGTATGCCCTGCTT	59.70	45.45
		Right	TCCTCTGTGATGCTGAAAGGT	59.86	47.62
P53	AH007665.2	Left	ACCCATCCACCTCTCATCAC	59.77	55.00
		Right	TCTACTCCCAACCACCCTTG	59.96	55.00
β-AKTİN	NM_001101.5	Left	TGCTATCCCTGTACGCCTCT	59.86	55.00
		Right	CTCCTTAATGTCACGCACGA	59.86	50.00

Kantitatif gen ekspresyon analizi

Elde edilen cDNA’ların konsantrasyonları eşitlenerek 1:10 oranında seyreltilti. Daha sonra SYBR Green yöntemi kullanılarak liken asitlerinin HepG2 kanser hücrelerindeki Tablo 6’da verilen ilgili genlerin (TXN, TRXR, BAX, BCL2, P53 ve β-Aktin) mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri, kantitatif olarak Real-Time PCR ile incelendi. Tablo 7’de verilen reaksiyon karışımı ve pipetleme prosedürüne göre deney gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. Bir Tüp için Real-Time PCR Reaksiyon Karışımı ve Pipetleme Prosedürü

Bileşen	Hacim (µL)
SYBR Green Master miks	10
Su	6
Left primer	1
Right primer	1
cDNA	2
TOPLAM	20

Her bir strip tüp içerisine en son 2'şer µL 1:10 seyreltilen cDNA'lerden eklenerek aşağıdaki Tablo 8'de verilen koşullarda Real-Time PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 8. SYBR Green Real-Time PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95	30 sn	1
Denatürasyon	95	5 sn	40
Primer bağlanma basamağı (Annealing)	57(Opsiyonel)	30 sn	
Primer Uzama Basamağı (Extension)	72	30 sn	

Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistikî analizler

Real-Time PCR sonucunda elde edilen kontrol ve muamele gruplarına ait CT değerlerine göre genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri aşağıda belirtilen formül kullanılarak Livak metodu ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) ile analiz edildi (Heid *et al.* 1996).

$$\begin{aligned}\Delta C_{T(\text{uygulama})} &= C_{T, \text{ hedef (uygulama)}} - C_{T, \text{ referans (uygulama)}} \\ \Delta C_{T(\text{kontrol})} &= C_{T, \text{ hedef (kontrol)}} - C_{T, \text{ referans (kontrol)}} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T(\text{uygulama})} - \Delta C_{T(\text{kontrol})} \\ 2^{-\Delta\Delta C_T} &= \text{Normalize edilen ekspresyon oranı}\end{aligned}$$

$C_{T, \text{ hedef (uygulama)}}$: Reaksiyon sırasında uygulama (muamele) grubundaki hedef genin amplifikasyonu ile anlamlı ışımanın verildiği miktarsal konsantrasyon değeri

$C_{T, \text{ referans (uygulama)}}$: Reaksiyon sırasında uygulama (muamele) grubundaki referans (housekeeping) genin amplifikasyonu ile anlamlı ışımanın verildiği miktarsal konsantrasyon değeri

$C_{T, \text{ hedef (kontrol)}}$: Reaksiyon sırasında kontrol grubundaki hedef genin amplifikasyonu ile anlamlı ışımanın verildiği miktarsal konsantrasyon değeri

$C_{T, \text{ referans (kontrol)}}$: Reaksiyon sırasında kontrol grubundaki referans (housekeeping) genin amplifikasyonu ile anlamlı ışımanın verildiği miktarsal konsantrasyon değeri

$\Delta C_{T(\text{uygulama})}$: Reaksiyon sırasında uygulama (muamele) grubundaki hedef gen ve referans (housekeeping) gen arasındaki miktarsal olarak anlamlı değişiminin gerçekleştiği değer farkı

$\Delta C_{T(\text{kontrol})}$: Reaksiyon sırasında kontrol grubundaki hedef gen ve referans (housekeeping) gen arasındaki miktarsal olarak anlamlı değişiminin gerçekleştiği değer farkı

Formülle elde edilen veriler daha sonra GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software, San Diego, CA) istatistik programı kullanılarak değerlendirildi ve Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p > 0,05$ = ns önemsiz (bir farkın olmadığı), $*p < 0,05$ önemli, $**p < 0,01$ çok önemli, $***p < 0,0005$ ve $****p < 0,0001$ yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

Protein Ekspresyon Analizi (Western Blot)

Hücrelerden total proteinin ekstrakte edilmesi

Sayımı yapılan HepG2 kanser hücrelerinden hücre kültürüne uyumlu petri kaplarının her birine 8 mL olarak (125.000 hücre/mL) ekildi ve hücrelerin yüzeylere yapışmaları için 37°C'de %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde %60-70 doluluğa ulaşınca kadar bekletildi. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırılarak, petri kapları DPBS tamponu ile yıkandı. Her bir muamele ve kontrol grubu üçer tekerrür olacak şekilde petri kaplarına sırasıyla 10 mL komplet DMEM besiyerinde hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonlarında hazırlanan liken asitleri ve sadece komplet DMEM besiyeri eklenerek hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre 24 ve 48 saat boyunca 37°C de %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. İnkübe edilmelerinin ardından besiyeri uzaklaştırılarak soğuk DPBS tamponu ile yıkama yapıldı. Buz üzerine konulan her bir petri kabına 500 µL 1X lizis tamponu (1 mM Fenilmetilsülfonil Flüorid (PMSF) içeren RIPA buffer) ilave edildi. Petri kapları 5 dk buz üzerinde bekletildikten sonra kazıyıcılar (cell scraper) ile hücreler petri kaplarından kazınarak 1,5 mL'lik ependorf tüplere alındı. Tüplerin her biri vortekslenerek +4°C'ye ayarlı sonikatörde kısa süreli bekletilerek parçalama yapıldı. Ardından 14.000 g'de +4°C'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant kısım (hücre lizatı) dikkatlice alınarak alikuatlara ayrıldı ve Western blot yapmak üzere -80°C'de saklandı (Fan *et al.* 2014).

Bradford (Coomassie blue) protein tayini

Kontrol ve muamele gruplarının her birinden hazırlanan hücre lizatlarındaki proteinlerin miktarını belirlemek için Bradford (Coomassie Blue) protein tayini yapıldı. Bu yöntem, farklı konsantrasyonlardaki proteinlere Coomassie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyanın bağlanması sonucunda boyanın sahip olduğu kırmızı rengin mavi renge dönüşmesi temeline dayanmaktadır ve oluşan bu mavi rengin şiddeti incelenecek olan numunedeki proteinin miktarı hakkında bilgi vermektedir. Renk şiddetini belirlemek için de 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alınır ki bu dalga boyunda boyaya bağlanan proteinler, maksimum absorbans vermektedir. Ancak proteinlerin absorpsiyon değerlerini biliyor olmak tek başına bize miktar hakkında pek bilgi vermek için yeterli olmayacaktır. Bu yüzden incelenecek numunelerde protein miktarını tayin edebilmek için absorbans değerlerini karşılaştırabileceğimiz bir

standarda ihtiyaç duyulur. Bu standard oluşturmak için bir protein ile proteinin belirli aralıklarla artan konsantrasyonu olacak şekilde çözeltiler hazırlanır (standart) ve Bradford protein tayin yöntemiyle absorpsiyon değerlerine bakılarak bir standart grafik elde edilir. Standart grafik, konsantrasyonları bilinen saf proteini içeren çözeltinin absorbans değerlerine göre hazırlanan ve daha sonrasında, ne kadar miktarda protein içerdiği bilinmeyen çözeltinin verdiği absorbans değerlerinin bu standart grafikteki eğri üzerinde yerine konulması ile bilinmeyen protein derişim değerinin saptandığı grafikdir. Bu grafikte kullanılan standart protein için ticari olarak satılan saf proteinler kullanılıp en yaygın olarak kullanılan protein standardı ise sığır serum albuminidir (BSA). Bu Bradford (Coomassie Blue) protein tayininde kullanılacak olan standart grafiği çizmek için Bradford çözeltisi ile BSA'nın (Sigma-Aldrich) 595 nm'de spektrofotometrede absorbanslarına bakılarak aşağıdaki prosedür gerçekleştirildi (Hukkamlı 2018).

1. Hazırlanan Bradford çözeltisinden 10 deney tüpüne 4900'er μL konuldu.
2. Daha sonra Tablo 9'da belirtilen ve 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan BSA çözeltisi aşağıdaki gibi sırasıyla deney tüplerine eklenerek son hacim 5000 μL 'ye tamamlanmış oldu.

Tablo 9. Standart Grafik Oluşturmak için Deney Tüplerine Eklenen Farklı Konsantrasyondaki BSA Çözelti Karışımı

	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	7.tüp	8.tüp	9.tüp	10.tüp
BSA (μL)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Su (μL)	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0

3. Kısa bir süre deney tüpleri vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
4. Ardından sadece Bradford Çözeltisini içeren kör tüpe karşılık 595 nm'de spektrofotometrede absorbans değerlerine bakılarak standart grafik çizildi.

Kontrol ve muamele gruplarına ait hücre lizatlarındaki proteinlerin miktarını belirlemek için ise aşağıdaki protokol takip edildi (Sonmez 2018).

1. Hücre lizatlarının her birinden 10'ar μL alınarak ependorflara konulan 90 μL kadar su içerisine aktarıldı.
2. Ardından 4900 μL Bradford çözeltisi deney tüplerine konulduktan sonra Tablo 10'da belirtildiği gibi bu protein çözeltileri eklendi.

Tablo 10. Bradford Protein Tayinin Uygulanma Prosedürü

Numune	Commessie Brilliant Blue Boyası (µL)	dH ₂ O (µL)	Protein Çözeltisi (µL)
Kör	4900 µl	100 µl	-
Örnek	4900 µl	90 µl	10 µl

3. Kısa bir süre deney tüpleri vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
4. Ardından 4900 µL Bradford çözeltisi ve 100 µL dH₂O içeren kör tüpe karşılık 595 nm’de spektrofotometrede absorbans değerlerine bakılarak protein miktarları belirlendi.

SDS Jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

Elde edilen hücre lizatlarındaki proteinleri molekül ağırlığına göre birbirinden ayırmak için ayırma ve yükleme jellerinin jel yüzdeleri Tablo 11 ve 12’den belirlenerek SDS-PAGE jeli hazırlandı. Tez kapsamında incelenecek olan TRXR1 antikorunun molekül kütlesi 55 kDa olduğundan dolayı %14’lük ayırma jelinin hazırlanmasına karar verildi. Bradford protein tayin yöntemiyle protein konsantrasyonları belirlenen her bir örneklere 1XSDS-PAGE yükleme tamponu ve 1:50 oranında β-merkaptotanol ilave edildikten sonra 95°C’ye ayarlı ısıtma blokunda 10 dk kaynatılıp proteinler denatüre hale getirilip 10 dk boyunca buz üzerinde bekletildi ve 20 µg protein (total hacim 15 µL) olacak şekilde yükleme jeline yüklendi. Daha sonra elektroforez cihazında ilk olarak 50 Voltta 30 dk yürütüldü. Protein markır vasıtasıyla numunelerin yükleme jelinden ayırma jeline geçtiği gözlemlendiğinde proteinler elektroforezde 120 Voltta 90 dk boyunca yürütüldü (Budak *et al.* 2016).

Tablo 11. SDS Jel Elektroforezi için Kullanılacak Ayırma Jeli Değerleri

Jel Yüzdesi	%6	%8	%9	%10	%12	%14
Distile Su (mL)	7,9	6,9	6,45	5,9	4,9	3,9
%30Akrilamid-Bisakrilamid (mL)	3	4	4,5	5	6	7,0
1.5 M TRİS PH:8,8 (mL)	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
%10 SDS (mL)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	1,5
%10 APS (mL)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	1,5
TEMED (mL)	0,012	0,009	0,075	0,006	0,006	6,0
TOPLAM (mL)	15	15	15	15	15	15

Tablo 12. SDS Jel Elektroforezi için Kullanılacak Yükleme Jeli Değerleri

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

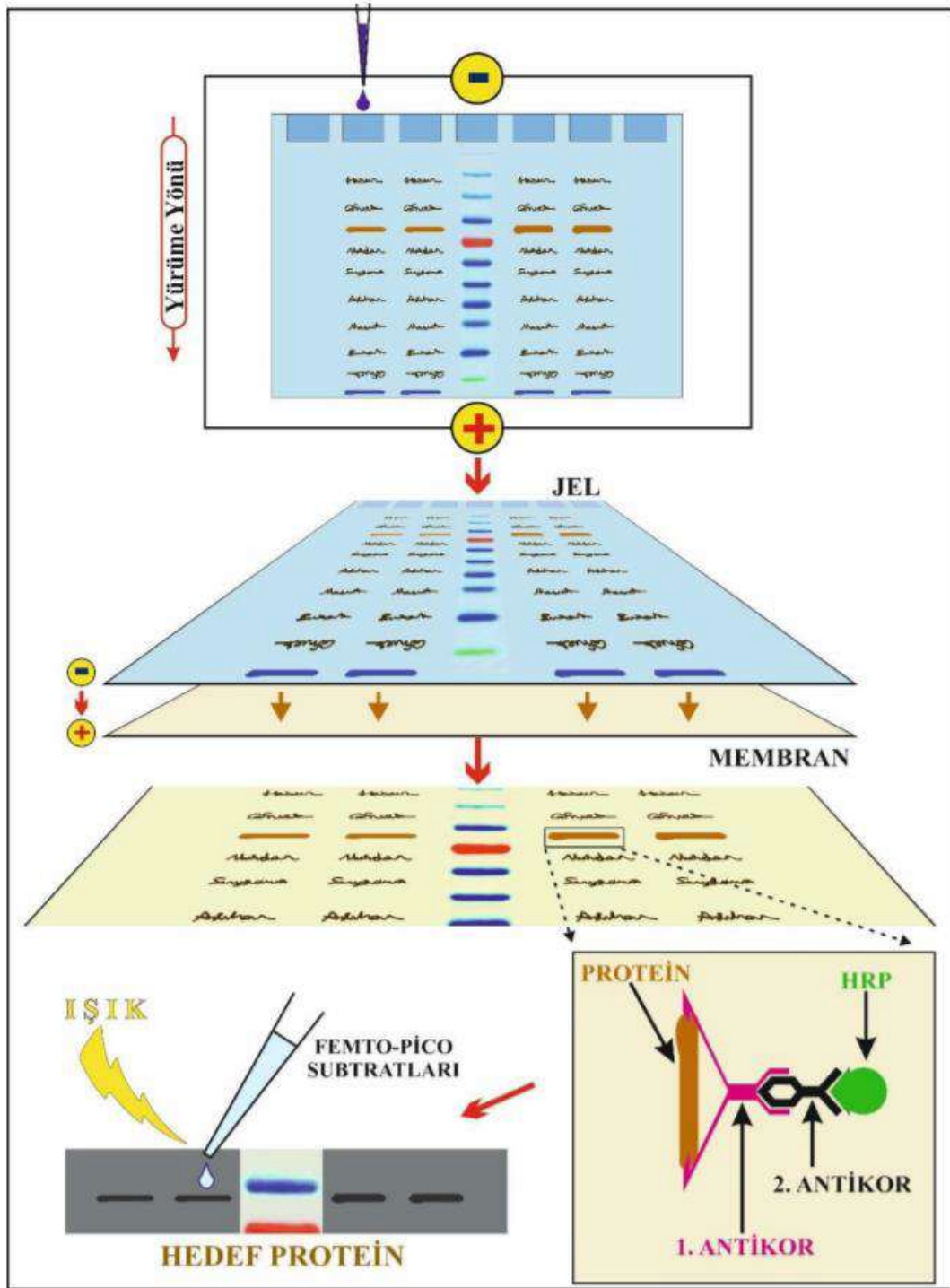
Jelde yürütülen proteinlerin membrana transfer (blotlama), bloklanma ve görüntülenme basamakları

SDS-PAGE jelinde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler Semidry Blotter cihaz yardımıyla jelden PVDF membranına transfer edildi. Bu süreçte blotlama prosedürü aşağıdaki şekilde yürütüldü (Budak *et al.* 2016):

1. Yükleme jeli kesilip atılan jel boyutuna göre kesilen PVDF membran, blotlama işleminde kullanılmadan önce 5 dk boyunca metanol ile muamele edildi.
2. Daha sonra hem jel hem de PVDF membran 5 dk boyunca 1X Transfer çözeltisi ile muamele edildi.
3. Semidry Blotter cihazı içerisine blotlanmak üzere sırası ile üst üste 1 parça blotlama kâğıdı, PVDF membran, jel, 1 parça blotlama kâğıdı yerleştirildi. Ardından cihazda 2,5 Amper, 25 Volt'da 7 dk süreyle blotlama işlemi gerçekleştirildi.
4. Proteinlerin blotlandığı membran 5 dk boyunca çalkalanarak 1XTBST ile yıkandı.
5. Membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında %5'lik bloklama çözeltisi ile muamele edildi.
6. Daha sonra membran 4°C'de 1 gece boyunca bloklama çözeltisi içerisinde 1:1.000 oranında seyreltilen TRXR1 fare monoklonal IgG primer antikor (sc-28321, Santa Cruz) ile inkübe edildi.
7. Inkübasyon süresi bittikten sonra membran 1XTBST içerisinde çalkalanarak 5 defa 5 dk boyunca yıkandı.
8. Yıkanan membran oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklama çözeltisi içerisinde 1:10.000 oranında seyreltilen HRP konjüge edilmiş keçi anti-fare IgG sekonder antikor (sc-2005, Santa Cruz) ile inkübe edildi.
9. Inkübasyon süresinin sonunda membran 1XTBST ile 5 kez 5 dk boyunca yıkandı.

10. Görüntüleme basamağında antikorun kimyasal sinyal oluşturmaları için ECL reagent substratları kullanılarak ikinci antikorla da muamele edilen membranın kemilüminesans görüntüsü ChemiDoc™ Touch Imaging System cihazı yardımıyla elde edildi (Şekil 37).
11. Ardından incelenen TRXR1 proteininin ve housekeeping protein olan β -AKTİN'in (sc- 47778, Santa Cruz) elde edilen görüntülerindeki kemilüminesans sinyal yoğunluğu ImageJ software programı kullanılarak proteinlerin kantitatif olarak miktarları belirlendi.

Deneyler 3 kez tekrarlanarak ImageJ software programında analiz yapılırken TRXR1 proteini, β -AKTİN proteine karşı normalize edildi. GraphPad Prism 7 Software istatistik programı ile de sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi ve Unpaired t-testi ile p değerleri saptandı. Saptanan bu değerler; $p>0,05$ = ns önemsiz (bir farkın olmadığı), $*p<0,05$ önemli, $**p<0,01$ çok önemli, $***p<0,0005$ ve $****p<0,0001$ yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.



Şekil 37. Western blot tekniğinin şematize gösterimi (Budak *et al.* 2016)

Tiyoredoksin Redüktaz Enzim Aktivite Ölçümü

Liken asitlerinin HepG2 kanser hücre hattında tiyoredoksin redüktaz enzimi aktivitesini nasıl etkilediğini belirlemek için Tablo 13'te pipetleme prosedürünün belirtildiği DTNB yöntemi kullanıldı (Hill *et al.* 1997). Bu yöntem, TRXR enziminin NADPH bağımlı olarak DTNB'de bulunan disülfid bağlarının aşağıda gösterilen indirgenme reaksiyonunu katalizlemesi temeline dayanmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda enzim aktivitesi, dakikada TNB oksidasyonunun belirlenmesi ile ölçülmektedir (Sönmez Aydın *et al.* 2021).



Kontrol ve liken asitleri ile muamele edilen gruplarda TRXR enzim aktivitesini belirlemek için aşağıdaki protokol gerçekleştirildi.

1. Sayımı yapılan HepG2 kanser hücrelerinden hücre kültürüne uyumlu petri kaplarının her birine 8 mL olarak (125.000 hücre/mL) ekildi ve hücrelerin yüzeylere yapışmaları için 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde %60-70 doluluğa ulaşmaya kadar bekletildi. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırılarak, petri kapları DPBS tamponu ile yıkandı. Her bir muamele ve kontrol grubu 3’er tekrür olacak şekilde petri kaplarına sırasıyla 10 mL komplet DMEM besiyerinde hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonlarında hazırlanan liken asitleri ve sadece komplet DMEM besiyeri eklenerek hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre 24 ve 48 saat boyunca 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. İnkübe edilmelerinin ardından besiyeri uzaklaştırılarak soğuk DPBS tamponu ile yıkama yapıldı. Buz üzerine konulan her bir petri kabına 500 µL 1X lizis tamponu ilave edildi. Petri kapları 5 dk buz üzerinde bekletildikten sonra kazıyıcılar kullanılarak hücreler petri kaplarından kazınarak 1,5 mL’lik ependorf tüplere alındı. Tüplerin her biri vortekslenerek +4°C’ye ayarlı sonikatörde kısa süreli bekletilerek parçalama yapıldı. Ardından 14.000 g’de +4°C’de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant kısım dikkatlice alınarak alikuatlara ayrılarak enzim aktivitesi ölçülmek üzere diğer basamaklar gerçekleştirildi.
2. Deneyde Tablo 13’te belirtilen reaktif karışımındaki bileşenlerinin her biri, sırasıyla kör ve numuneler için belirtilen miktarlarda 1.000 µL’lik küvetlere pipetlendi. Her bir grup 3’er tekrür olacak şekilde ölçüldü.

Tablo 13. TRXR1 Enzim Aktivite Ölçümü için Kullanılan Reaktif Karışım İçeriği

Bileşenler	Kör (µl)	Numune (µl)
10 mM K-fosfat/ 10mM EDTA tamponu	200	200
dH ₂ O	580	480
Sığır Serum Albumin (0,2 mg/mL)	100	100
DTNB (5 mM)	100	100
NADPH (0,2 mM)	-	100
Hücre lizatı	20	20

3. Daha sonra RIPA tamponu ile lize edilen taze hücre lizat örneklerinden (20-30 µL) küvetlere eklendi.
4. Spektrofotometre ile 412 nm'de küvet çıkartılmadan 3 dk boyunca her 60 saniyede bir olmak üzere aktivite ölçümü yapılarak absorbans artışı belirlenerek kaydedildi.
5. Ardından Lambert-Beer denklemi kullanılarak 1 dakikada harcanan DTNB miktarı belirlenerek aşağıda belirtilen formül yardımıyla enzim aktivitesi hesaplandı.

$$\text{Enzim Aktivitesi (EÜ/mL)} = \frac{\Delta OD}{14,15} \times \frac{VT}{VE} \times Sf \times \frac{1}{2}$$

EÜ/ml: 1 mL'deki enzim ünitesi.

ΔOD: Bir dakikadaki 412 nm'de ölçülen absorbans değişimi.

14,15: Ekstriksiyon katsayısı.

V_T: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi.

V_E: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi.

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır).

6. Daha sonra hesaplanan enzim aktivite değerleri GraphPad Prism 7 Software istatistik programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve Unpaired t-testi ile p değerleri saptandı. Saptanan bu değerler; p>0,05 = ns önemsiz (bir farkın olmadığı), *p<0,05 önemli, **p<0,01 çok önemli, ***p<0,0005 ve ****p<0,0001 yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

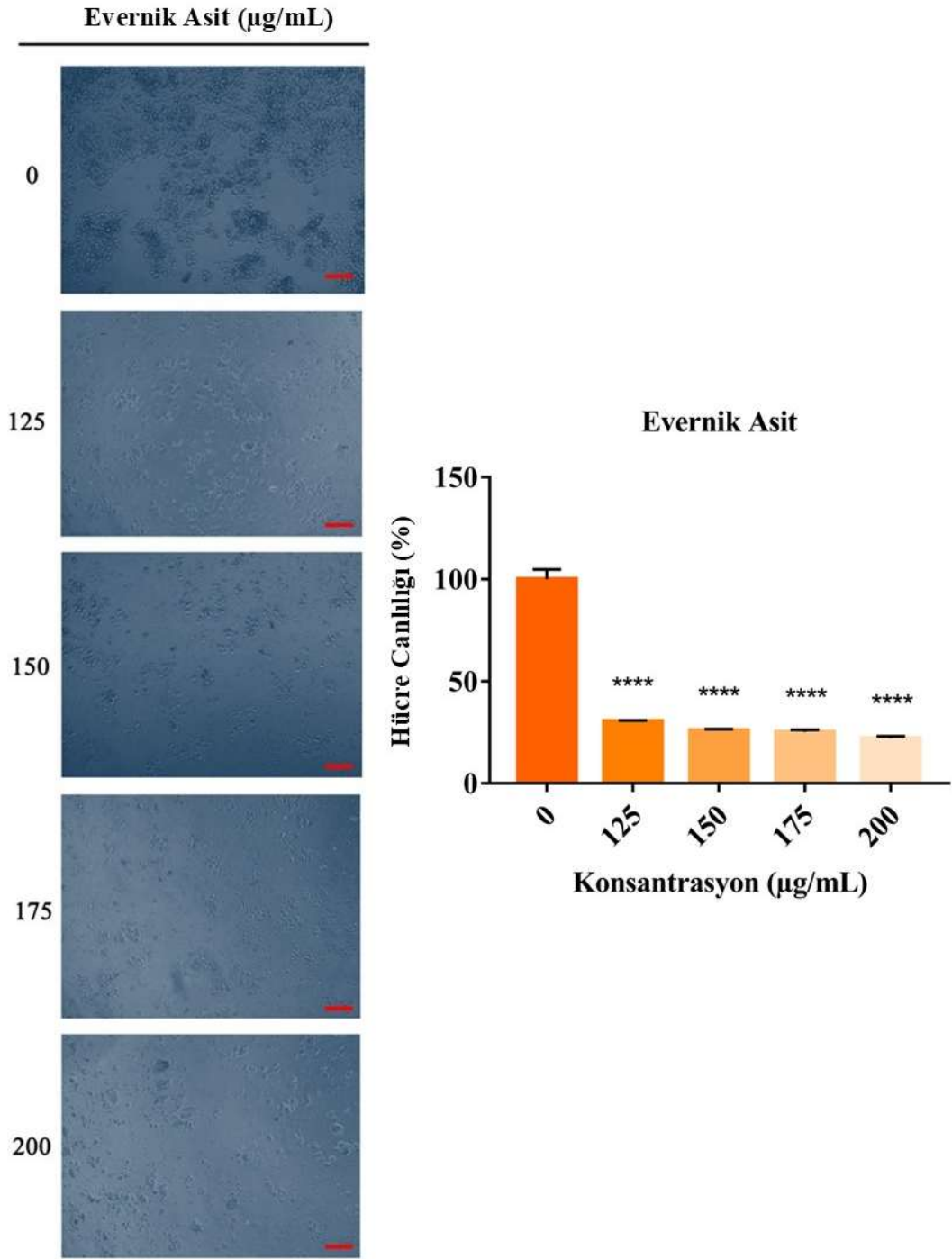
ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik asitlerinin insan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattı üzerindeki doz ve zaman bağımlı antiproliferatif etkileri *in vitro* olarak XTT testiyle araştırıldı. XTT testi sonuçlarına göre evernik, vulpinik ve difraktaik asitlerinin hücrelere muamele koşulları belirlendikten sonra liken asitlerinin hücrelerdeki apoptotik etkileri, Annexin V-FITC/PI metodu ile migrasyon üzerindeki etkileri ise yara iyileştirme testi ile incelendi. Liken asitlerinin hücrelerde tiyoredoksin sisteme ait TXN, TRXR ve apoptotik yolak genlerinin (BAX, BCL2 ve P53) kantitatif gen ekspresyon profillerine olan etkisi Real-Time PCR yöntemiyle incelendi. Daha sonra çalışmada ele alınan TRXR proteininin kantitatif ekspresyon seviyesinde liken asitlerinin muamelesi ile bir değişikliğin olup olmadığı Western blot tekniği kullanılarak gösterildi. Ayrıca liken asitlerinin hücrelerde TRXR proteinin aktivitesi üzerindeki etkisi enzim aktivite ölçümü ile incelendi.

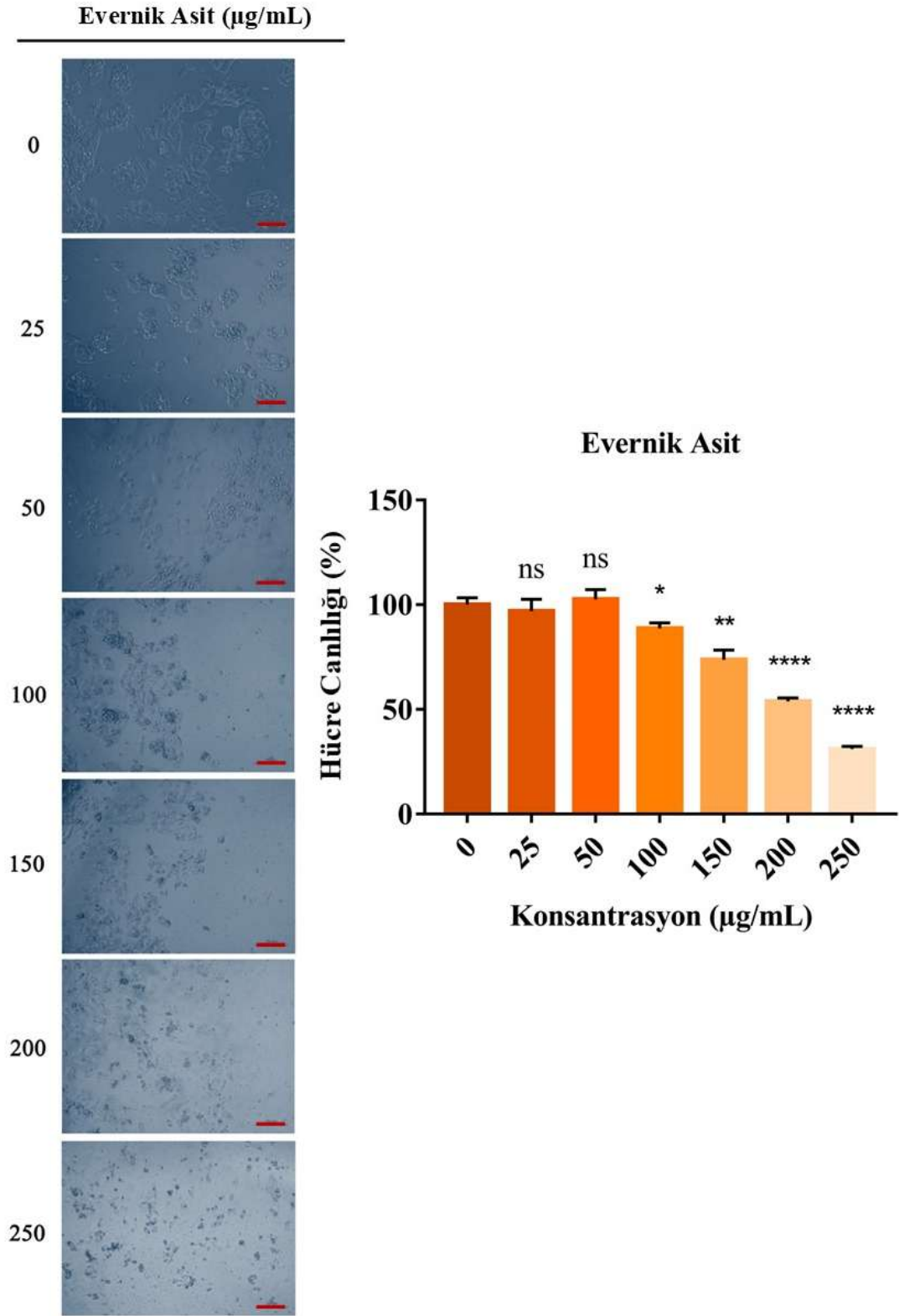
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattı Üzerinde Liken Asitlerinin Antiproliferatif Etkileri

Bu tez kapsamında evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik asitlerinin doz ve zamana bağlı bir şekilde insan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkileri *in vitro* olarak XTT testiyle araştırıldı. Elde edilen sonuçlar, Şekil 38-44 arasında ve hesaplanan IC₅₀ değerleri ise Tablo 14'te verilmiştir.

Evernik asit ile HepG2 hücre hattı 24 saat boyunca doz bağımlı olarak (10, 25, 50, 100 ve 250 µg/mL) inkübe edildikten sonra XTT testi sonuçlarına göre evernik asidin 100 ile 250 µg/mL arasında antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır ($p<0,0001$). Daha sonra 100 ile 250 µg/mL arasındaki dozlarla yapılan XTT testi sonuçlarına göre ise evernik asidin 125 µg/mL konsantrasyonunda hücrelerin %50'sinden fazlasını öldürdüğü gözlenmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 38). 48 saatlik inkübasyonda ise doz bağımlı olarak 100 ile 250 µg/mL arasında antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır ($p<0,0001$) (Şekil 39). Evernik asidin HepG2 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik IC₅₀ değerleri sırasıyla $114,94\pm2,25$ ve $203,78\pm3,25$ µg/mL olarak hesaplanmıştır (Tablo 14).



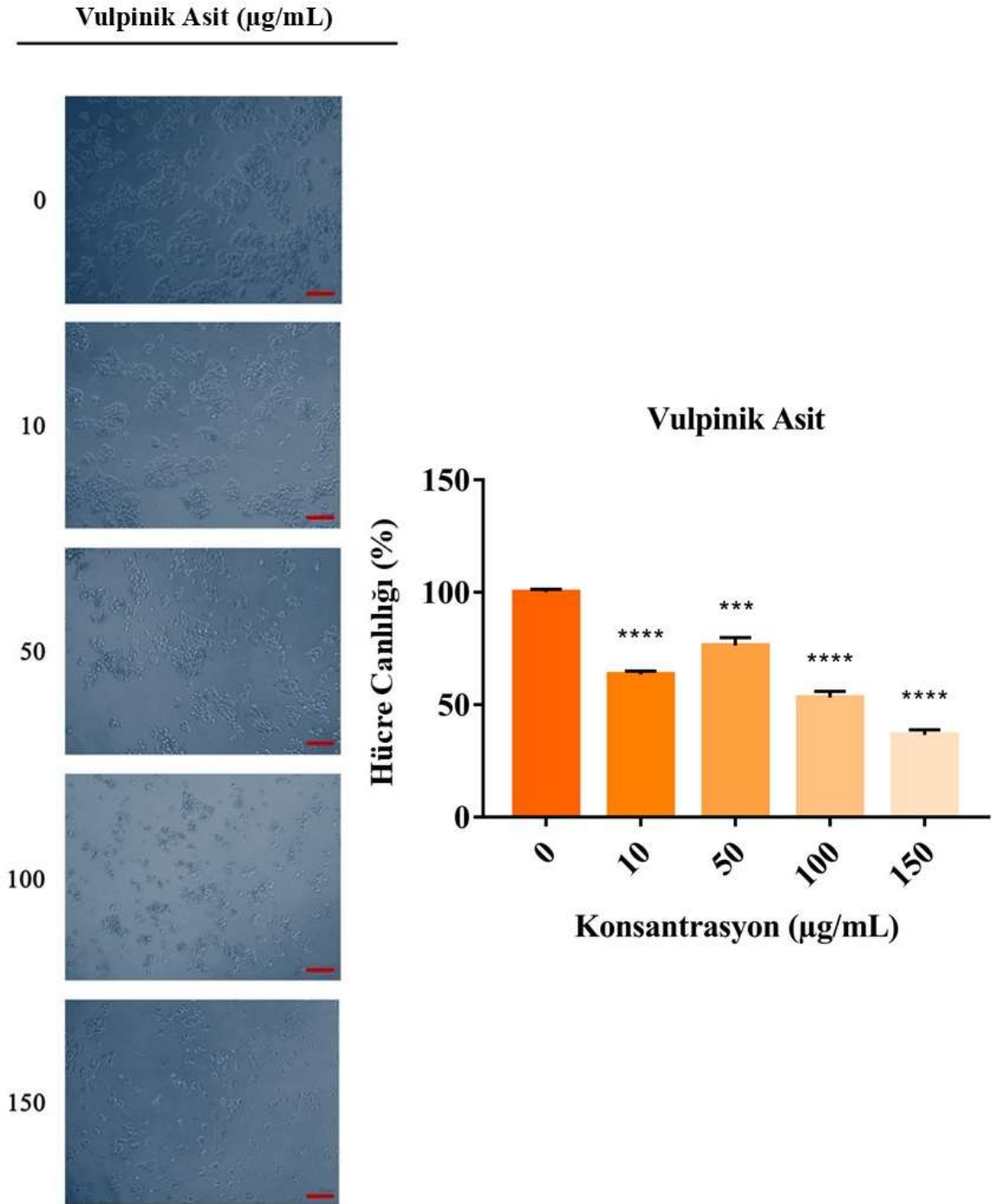
Şekil 38. Evernik asidin doz (125-200 $\mu\text{g/mL}$) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (Ölçek çubuğu: 50 μm)



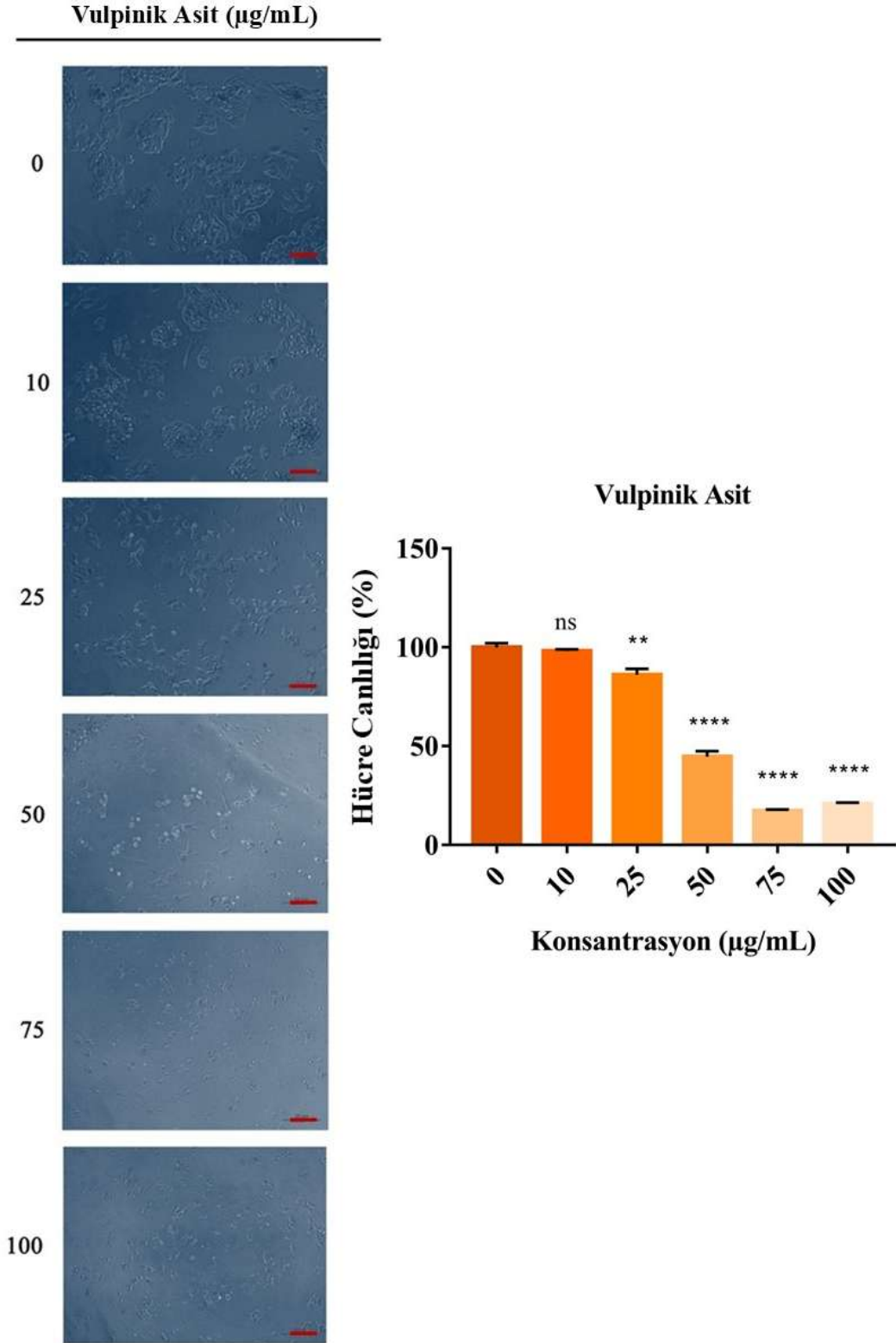
Şekil 39. Evernik asidin doz (25-250 µg/mL) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (Ölçek çubuğu: 50 µm)

Vulpinik asit, HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra doz bağımlı olarak 10 ile 150 µg/mL arasında ($p < 0,0001$), 48 saatlik inkübasyonun sonunda ise doz bağımlı olarak 10 µg/mL ($p > 0,05$) ile 100 µg/mL ($p < 0,0001$) arasında antiproliferatif etki

gösterdiği (Şekil 40 ve Şekil 41) ve zaman bağımlı olarak hesaplanan IC_{50} değerlerinin sırasıyla $112,91 \pm 2,55$ ve $48,73 \pm 1,02$ $\mu\text{g/mL}$ olduğu gözlenmiştir (Tablo 14).



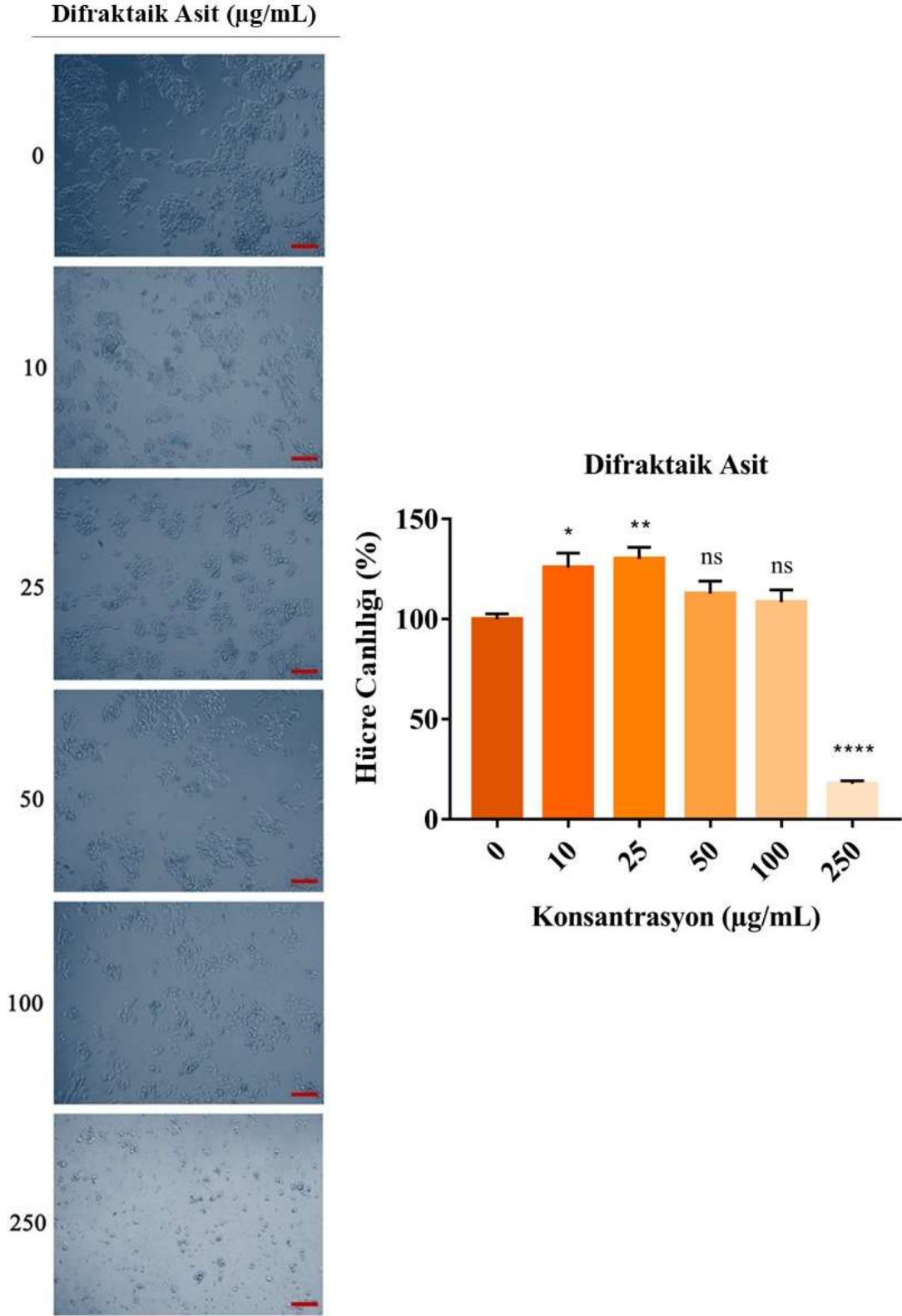
Şekil 40. Vulpinik asidin doz (10-150 $\mu\text{g/mL}$) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (Ölçek çubuğu: 50 μm)



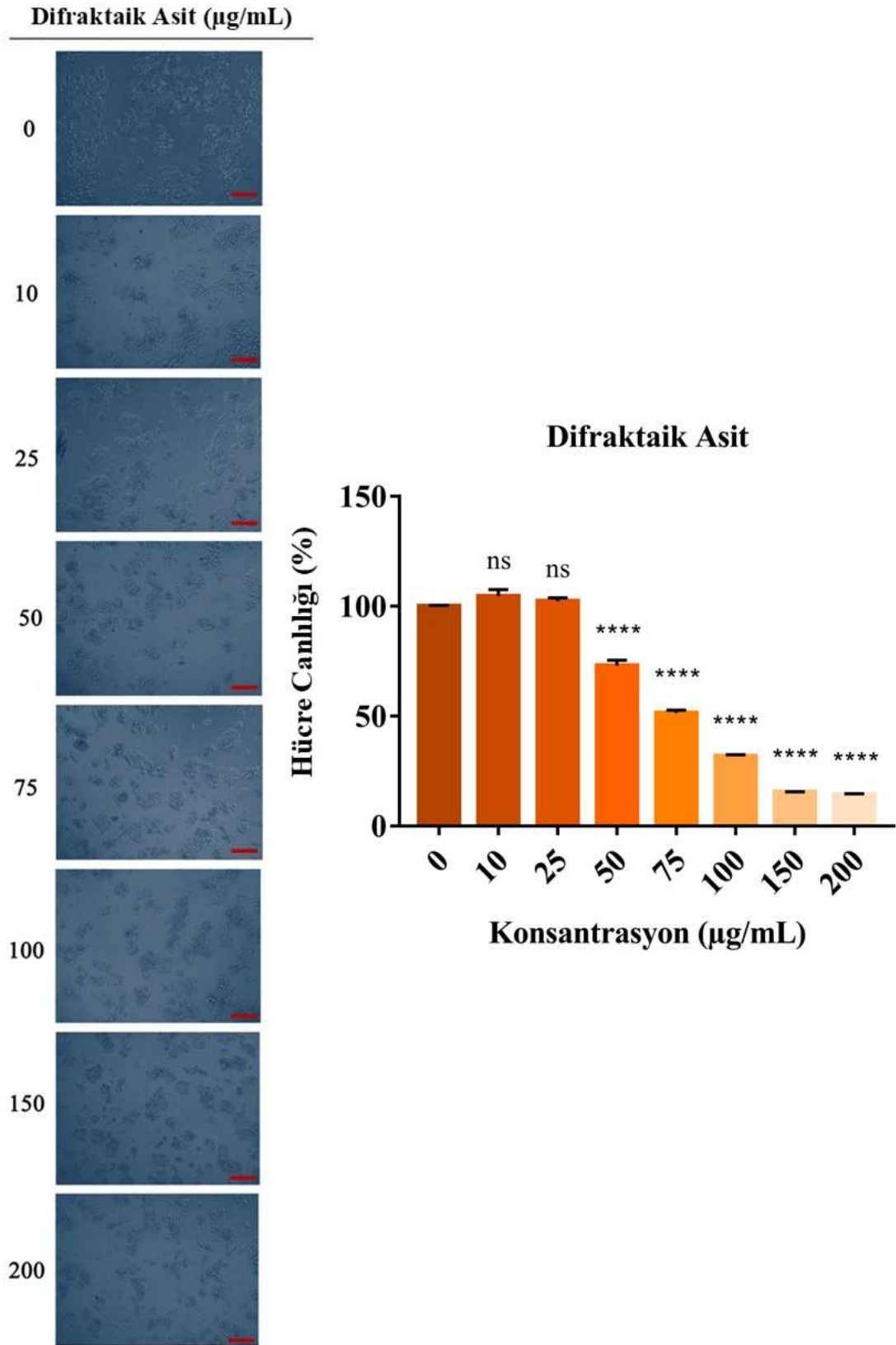
Şekil 41. Vulpinik asidin doz (10-100 $\mu\text{g/mL}$) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (Ölçek çubuğu: 50 μm)

Şekil 42’de gösterildiği üzere difraktaik asidin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyonun ardından 100 $\mu\text{g/mL}$ ’e ($p>0,05$) kadar önemli derecede bir antiproliferasyon aktivite göstermediği öte yandan, inkübasyon süresi 48 saat’e çıkarıldığında doz bağımlı olarak

HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiş (Şekil 43) ve IC₅₀ değeri 78,07±1,60 µg/mL olarak hesaplanmıştır (p<0,0001) (Tablo 14).

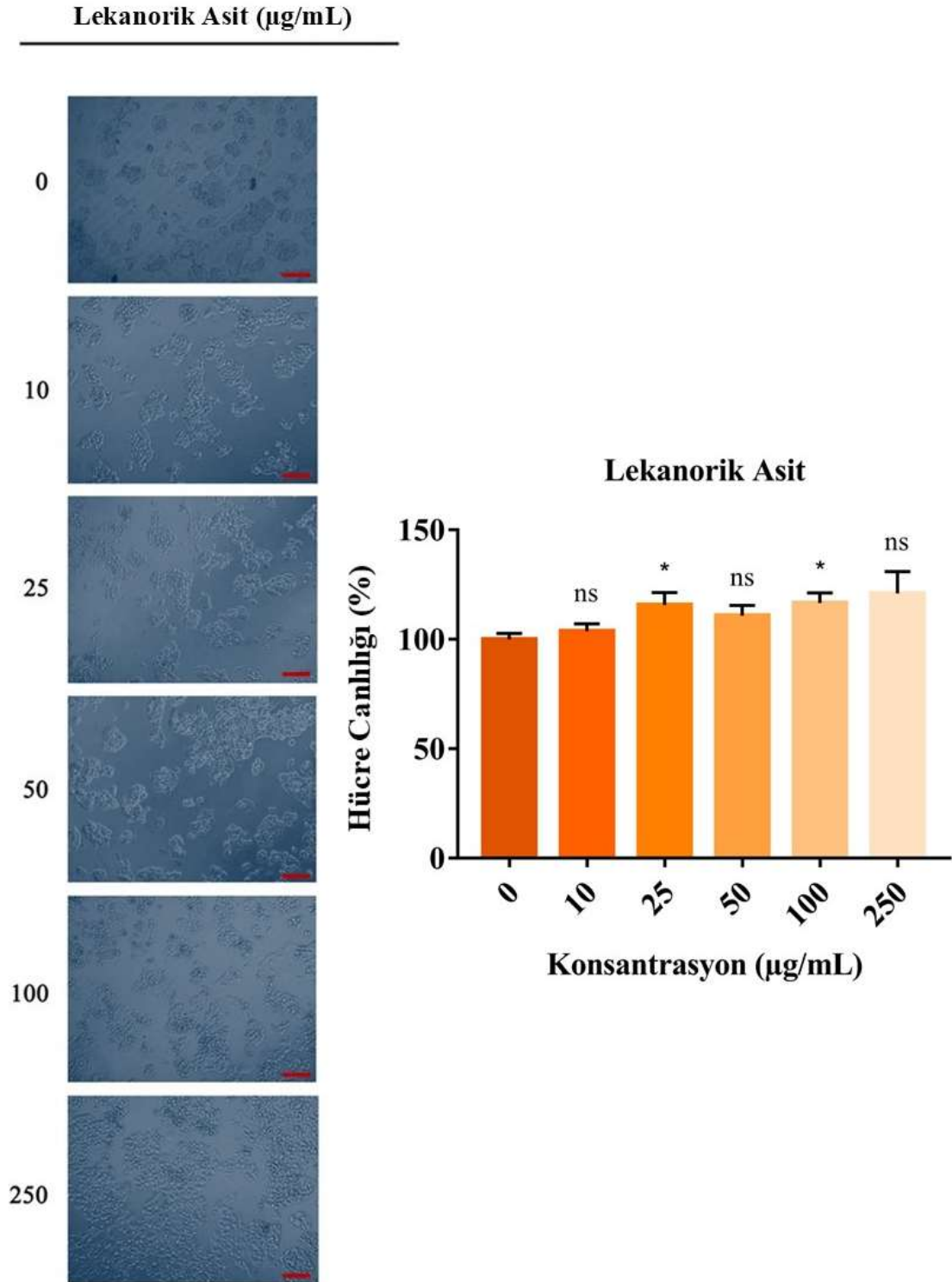


Şekil 42. Difraktaik asidin doz (10-250 µg/mL) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (Ölçek çubuğu: 50 µm)



Şekil 43. Difraktaik asidin doz (10-200 $\mu\text{g/mL}$) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (Ölçek çubuğu: 50 μm)

HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyonun sonunda lekanorik asidin 250 $\mu\text{g/mL}$ 'e kadar herhangi bir antiproliferatif etki göstermediği saptanmıştır ($p>0,05$) (Şekil 44 ve Tablo 14).



Şekil 44. Lekanorik asidin doz (10-250 $\mu\text{g/mL}$) ve zaman bağımlı (24 saat) olarak HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (Ölçek çubuğu: 50 μm)

Tablo 14. Liken Asitlerinin (Evernik Asit, Vulpinik Asit, Difraktaik Asit ve Lekanorik Asit) HepG2 Hücre Hattı Üzerinde 24 ve 48 Saat Muameleleri Sonrası Hesaplanan IC₅₀ (µg/mL) Değerleri

Liken Asitleri	24 Saat için IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)	48 Saat için IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)
Evernik asit	114,94±2,25	203,78±3,25
Vulpinik asit	112,91±2,55	48,73±1,02
Difraktaik asit	187,35±3,42	78,07±1,60
Lekanorik asit	>250	>250

Elde edilen tüm bulgulara göre, liken asitlerinden evernik, vulpinik ve difraktaik asitlerin insan karaciğer (HepG2) kanser hücrelerinin *in vitro* büyümelerini inhibe ederek sitotoksik aktivite gösterdiği, bunun aksine lekanorik asidin ise herhangi bir sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre daha yüksek antiproliferatif etki sergileyen dozlar göz önüne alındığında, bundan sonra yapılan deneylerde hücrelerin muamele edileceği liken asitlerinin belirlenen inkübasyon saat dilimleri ve IC₅₀ değerleri; evernik asit için 24 saatlik muamelede IC₅₀=114,94±2,25 µg/mL, vulpinik asit için 48 saatlik muamelede IC₅₀=48,73±1,02 µg/mL ve difraktaik asit için 48 saatlik muamelede IC₅₀=78,07±1,60 µg/mL olarak belirlenmiştir. Lekanorik asit ise herhangi bir antiproliferatif etki göstermediği için diğer deney basamaklarında kullanılmamıştır.

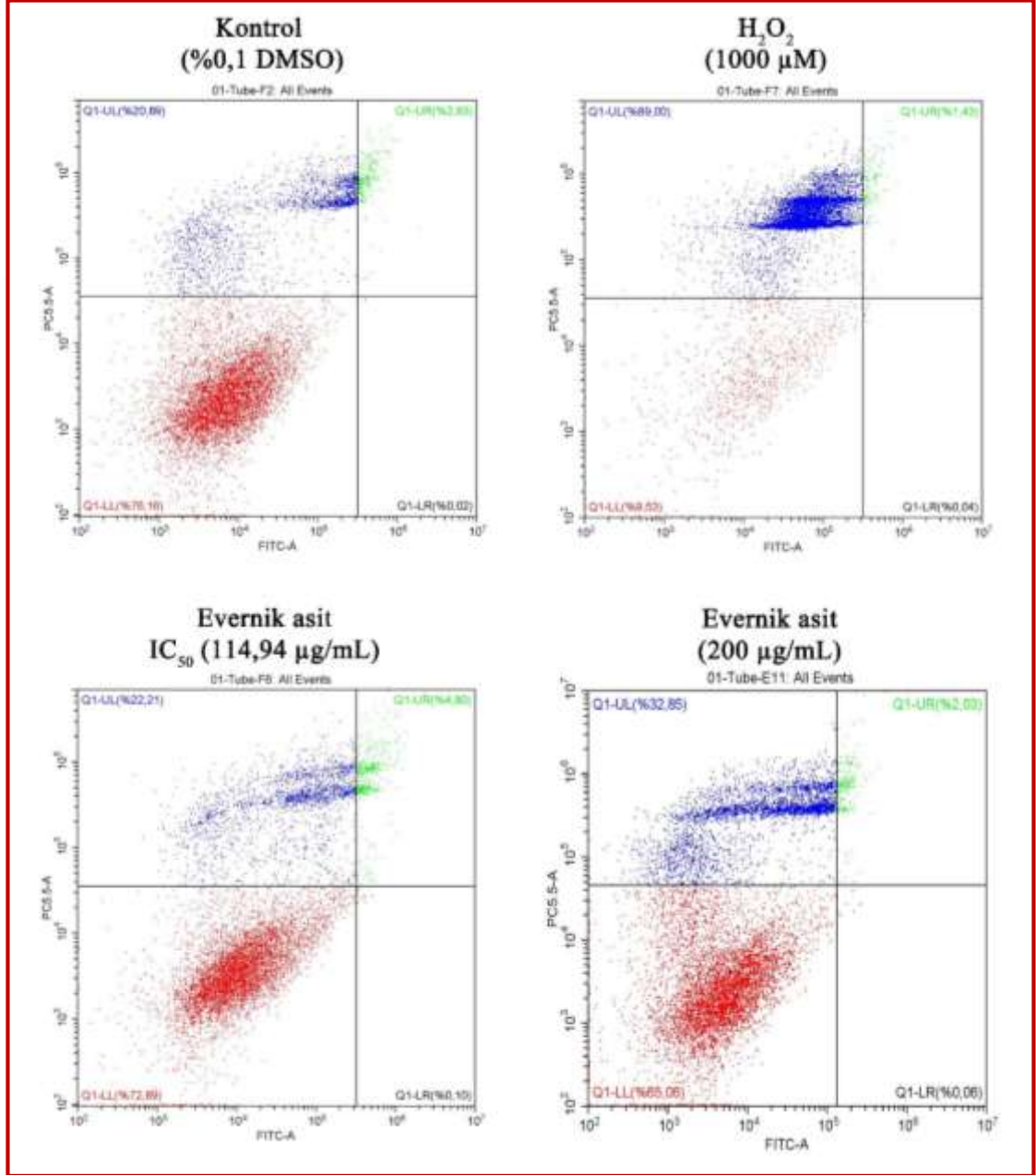
İnsan Karaciğer (HepG2) Kanser Hücre Hattında Liken Asitlerinin Apoptoz ve Migrasyon Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında liken asitlerinin apoptotik etkisinin flow (akım) sitometrik analizi ile değerlendirilmesi

Tez kapsamında incelenen liken asitlerinin insan karaciğer (HepG2) hücre hattındaki antiproliferatif etkilerinin hücrelerde apoptozun indüklenmesiyle ortaya çıkıp çıkmadığını belirlemek için, XTT testleri sonucunda saptanan doz ve zaman bağımlı olarak en etkin liken asitleri ile muamele edilen HepG2 kanser hücrelerinde Annexin V-FITC/PI metodu kullanıldı ve hücreler FITC-konjuge Annexin V ve PI ile boyanarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin dağılımı flow sitometrisi ile belirlendi. Bu deney sonucunda incelenen liken asitlerinin HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri Şekil 45 ve 46'da ve elde edilen istatistiki değerler ise Tablo 15'te verilmiştir.

Evernik asidin muamele edilmek üzere belirlenen inkübasyon saat diliminde (24 saat) ve IC₅₀ değerinde (114,94±2,25 µg/mL) HepG2 kanser hücrelerine uygulanması sonrasında apoptotik etkisi incelenmiş ve erken apoptoz oranında (Annexin V-FITC-pozitif / PI-negatif

hücreler) bir değişiklik oluşturmazken geç apoptoz oranını (Annexin V-FITC-pozitif / PI-pozitif hücreler) %2,93'ten %4,80'e ve toplam apoptoz oranını %2,95'ten %4,90'a çıkarmıştır (Şekil 45 ve Tablo 15). Bu veriler göz önüne alındığında HepG2 kanser hücrelerinde evernik asidin düşük derecede bir apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Evernik asit için yüksek doz uygulaması da (200 $\mu\text{g/mL}$) yapılmıştır. Fakat, bu durumun sonucu etkilemediği gözlenmiştir.

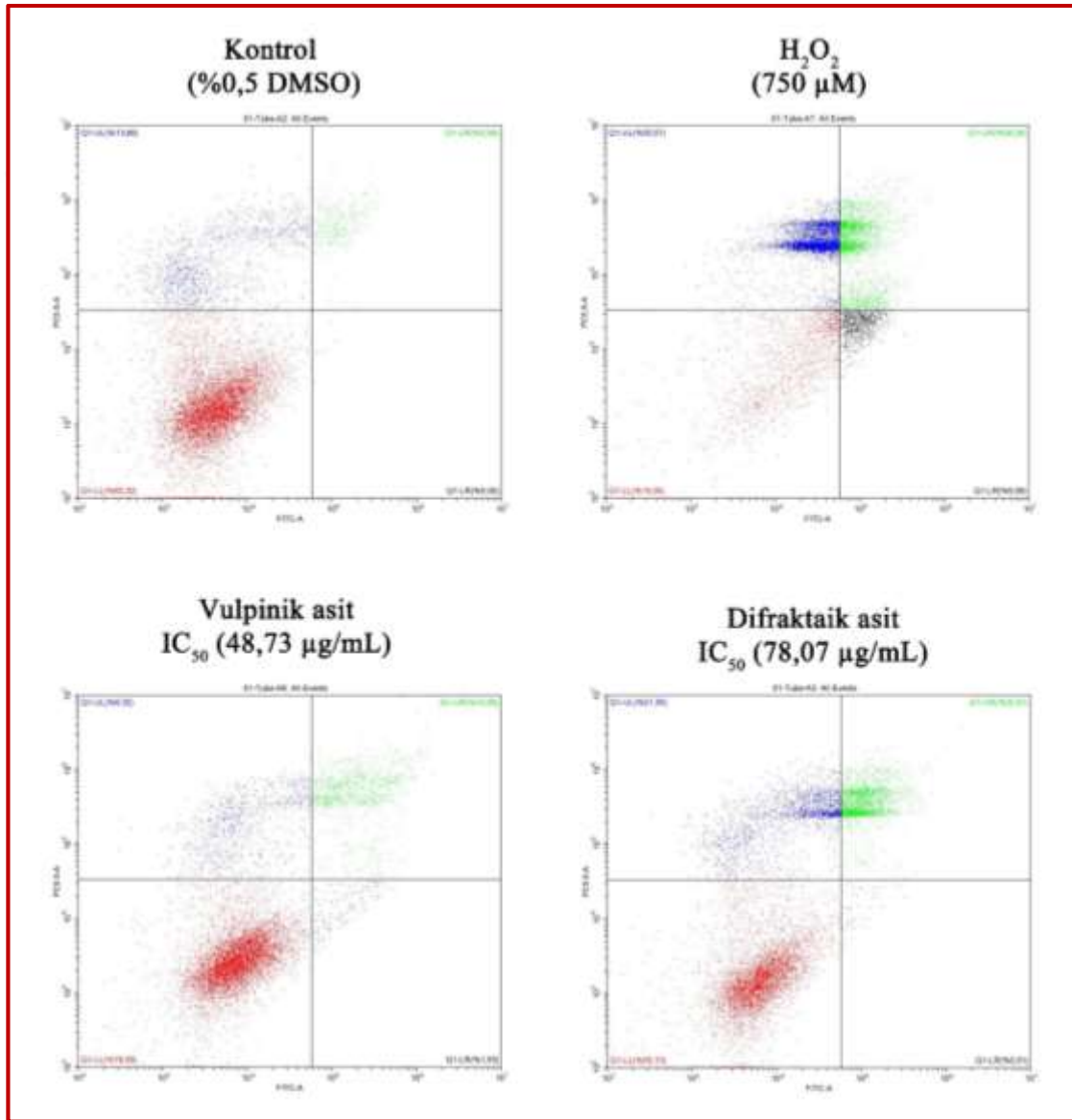


Şekil 45. Evernik asidin insan karaciğer HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri

Vulpinik asidin belirlenen inkübasyon saat diliminde ve IC_{50} değerinde HepG2 kanser hücrelerine muamelesinin ardından apoptotik etkisi incelenmiş ve Şekil 46 ve Tablo 15'te belirtildiği üzere erken apoptoz oranı %0,02'den %1,53'e, geç apoptoz oranı %2,95'ten %10,06'a ve toplam apoptoz oranı da %3'ten %11,59'a yükselmiştir. Bu sonuçlar, vulpinik

asidin HepG2 kanser hücrelerini yüksek oranda geç apoptoza yönlendirerek hücreler üzerinde antiproliferatif etki sergilediğini göstermektedir.

Difraktaik asidin belirlenen inkübasyon saat diliminde ve IC_{50} değerinde HepG2 kanser hücrelerine muamelesinden sonra apoptotik etkisi incelenmiş ve difraktaik asit, kontrol grubuna (%2,95) kıyasla hücrelerin büyük çoğunluğunu geç apoptoz (%22,81)'a yöneltmiş ve toplam apoptoz oranını da %3'ten %23,43'e çıkarmıştır (Şekil 46 ve Tablo 15). Elde edilen bu sonuçlara göre difraktaik asidin HepG2 kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkisi apoptozun indüklenmesiyle ortaya çıkmıştır.



Şekil 46. Vulpinik ve difraktaik asitlerinin insan karaciğer HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri

Tüm bu veriler ışığında incelenen üç liken asidi içerisinde HepG2 hücre hattı üzerinde en yüksek apoptotik etkiyi difraktaik asidin, en düşük apoptotik etkiyi evernik asidin sergilediği görülmüştür (Tablo 15).

Tablo 15. Liken Asitlerinin (Evernik Asit, Vulpinik Asit ve Difraktaik Asit) İnsan Karaciğer (HepG2) Hücre Hatları Üzerindeki Erken, Geç ve Toplam Apoptotik (%) Değerleri

İnkübasyon Süresi	İncelenen Örnekler	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	Toplam Apoptoz (%)
24 Saat	Kontrol	0,02	2,93	2,95
	Evernik asit	0,10	4,80	4,90
	H ₂ O ₂	0,04	1,43	1,47
48 Saat	Kontrol	0,05	2,95	3,00
	Vulpinik asit	1,53	10,06	11,59
	Difraktaik asit	0,51	22,81	23,43
	H ₂ O ₂	9,59	28,29	37,88

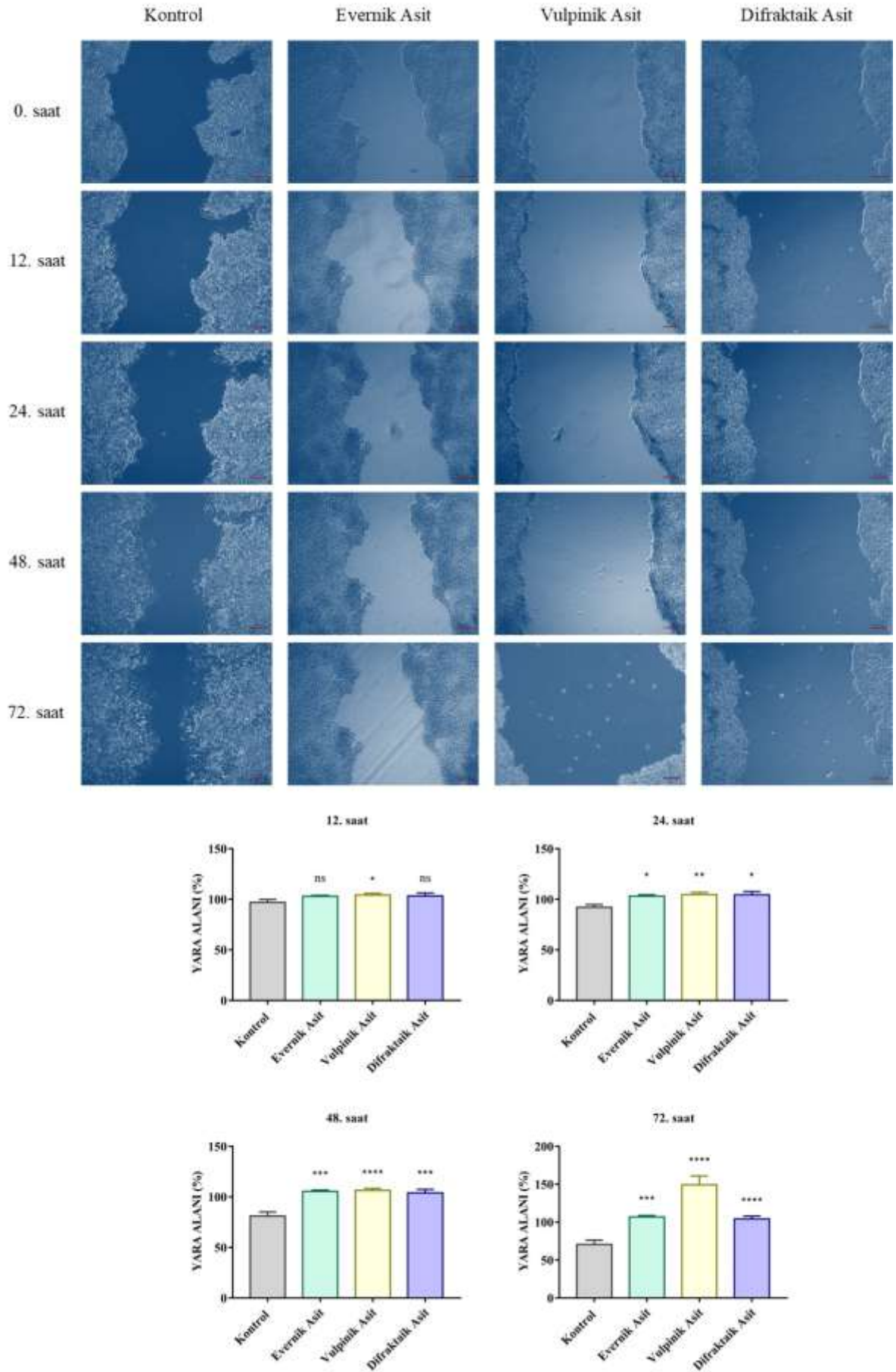
İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattının liken asitleri ile muamelesi sonrası migrasyon analiz sonuçları

Evernik, vulpinik ve difraktaik asidin HepG2 kanser hücrelerinin migrasyonu üzerine etkisini belirlemek için yara iyileştirme testi (wound healing assay) yapıldı. Yara alan yüzdelерinin karşılaştırıldığı Şekil 47’de görüldüğü üzere 12. saat sonunda kontrol grubuna kıyasla hücrelerin yara alanının yüzdesini arttırarak migrasyonu önemli derecede baskılayan liken asidi vulpinik asit iken ($p<0,05$) evernik asit ve difraktaik asit yara alanı yüzdesinde bir değişikliğe sebep olmamış ve migrasyon üzerine herhangi bir etki göstermemiştir ($p>0,05$).

24. saat sonundaki sonuçlara göre üç liken asidinin de migrasyonu inhibe ettiği görülmüştür. Kontrol grubundaki yara alan yüzdesine kıyasla liken asitlerinin muamele edildiği gruplarda yara alan yüzdesinin artması ile evernik ve difraktaik asidin migrasyonu önemli derecede ($p<0,05$), vulpinik asidin ise çok önemli derecede ($p<0,01$) engellediği saptanmıştır (Şekil 47).

48. saat sonundaki sonuçlarına göre evernik ($p<0,0005$), vulpinik ($p<0,0001$) ve difraktaik asidin ($p<0,0005$) yüksek derecede migrasyonu engelleyici etkisinin olduğu gözlenmiştir (Şekil 47).

72. saat sonundaki sonuçlara göre de evernik ($p<0,0005$), vulpinik ($p<0,0001$) ve difraktaik asidin ($p<0,0001$) yüksek derecede migrasyonu engelleyici etkisinin olduğu gözlenmiştir (Şekil 47).



Şekil 47. Liken asitlerinin insan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattı üzerindeki migrasyon etkileri (Ölçek çubuğu: 50 µm)

İnsan Karaciğer (HepG2) Kanseri Hücresi Hattında Liken Asitlerinin Tioredoksin, Tioredoksin Redüktaz 1 ve Apoptoz İlişkili Genlerin Kantitatif Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

Belirlenen inkübasyon saat dilimlerinde (24 veya 48 saat) ve IC₅₀ değerlerinde (Tablo 14) liken asitlerinin muamelesinden sonra insan karaciğer (HepG2) hücrelerinden total RNA, PureLink™ RNA Mini Kiti kullanılarak izole edildi. İzole edilen RNA örneklerinin saflık dereceleri ve konsantrasyonları nanodrop ile belirlendi ve sonuçlar Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16. HepG2 Kanseri Hücrelerine Ait Kontrol Grubundan ve Liken Asitleri ile Muamele Gruplarından İzole Edilen Total RNA’ların Saflık Dereceleri ve Konsantrasyon Miktarları

İnkübasyon Süresi	Deney Grupları	RNA Saflık (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	RNA Konsantrasyonları (ng/μl)
24 Saat	Kontrol 1	2,128	808,951
	Kontrol 2	2,126	875,04
	Evernik 1	2,097	285,566
	Evernik 2	2,114	564,24
48 Saat	Kontrol 1	2,119	725,9015
	Kontrol 2	2,114	953,981
	Kontrol 3	2,118	416,8255
	Vulpinik 1	2,150	386,1105
	Vulpinik 2	2,149	453,6865
48 Saat	Kontrol 1	2,146	731,525
	Kontrol 2	2,142	625,817
	Kontrol 3	2,162	738,13
	Difraktaik 1	2,121	242,21
	Difraktaik 2	2,138	271,178
	Difraktaik 3	2,112	174,595

İzole edilen total RNA’lardan cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti protokolüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’ların saflık dereceleri ve konsantrasyonları nanodrop cihazı ile ölçüldü (Tablo 17) ve Real-Time PCR deneyi esnasında cDNA konsantrasyonunun farklı olması sonucunda cihazın farklı CT değerleri vermesiyle sonuçların güvenilirliği azalacağından bu sorunu önlemek için deneyden önce cDNA örneklerinin konsantrasyonları eşitlendi.

Tablo 17. Total RNA Örneklerinden Sentezlenen cDNA Örneklerinin Saflık Dereceleri ve Konsantrasyon Miktarları

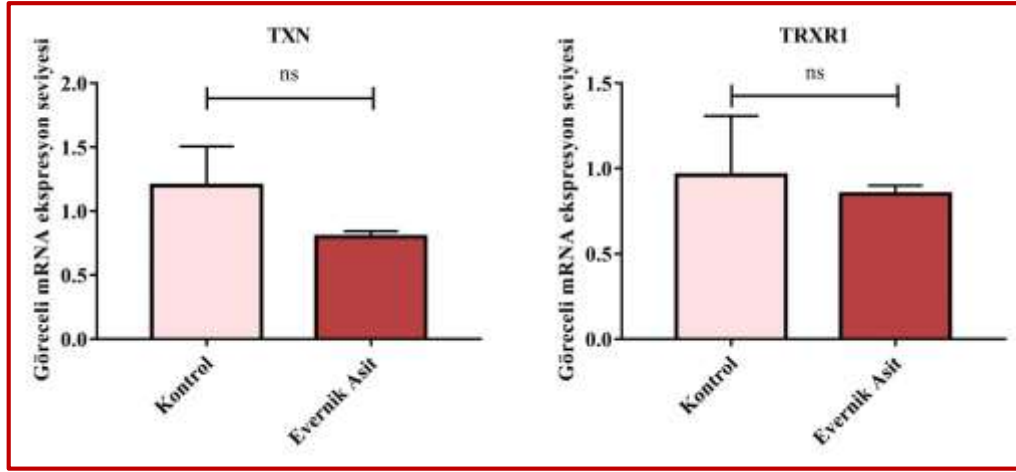
İnkübasyon Süresi	Deney Grupları	cDNA Saflık (A_{260}/A_{280})	cDNA Konsantrasyonları (ng/ μ l)
24 Saat	Kontrol 1	1,7283	1174,9
	Kontrol 2	1,7464	923,5
	Evernik 1	1,8426	2924,7
	Evernik 2	1,8619	2493,5
48 Saat	Kontrol 1	1,8850	2205,3
	Kontrol 2	1,9225	1255,2
	Kontrol 3	1,8445	2370
	Vulpinik 1	1,8514	2466,4
	Vulpinik 2	1,8341	2995,4
48 Saat	Kontrol 1	1,8211	2979,2
	Kontrol 2	1,8929	2712,5
	Kontrol 3	1,9114	2548,9
	Difraktaik 1	1,9127	2536,8
	Difraktaik 2	1,9258	2375,5
	Difraktaik 3	1,9308	2267,2

Kantitatif gen mRNA ekspresyon analiz sonuçları

Total RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldıktan sonra SYBR Green Real-Time PCR protokolü izlenerek TXN, TRXR1, BAX, BCL2 ve P53 kantitatif gen mRNA ekspresyon analizi yapıldı. BAX ve BCL2 gen ekspresyon seviyeleri tek başına değerlendirildiklerinde hücrelerin apoptoza gidip gitmediği hakkında bilgi vermek için yeterli olmadığından bu genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin oranlarının (BAX/BCL2) incelenmesi gerekir. Bu yüzden deney sonucunda elde edilen veriler, BAX/BCL2 şeklinde istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir.

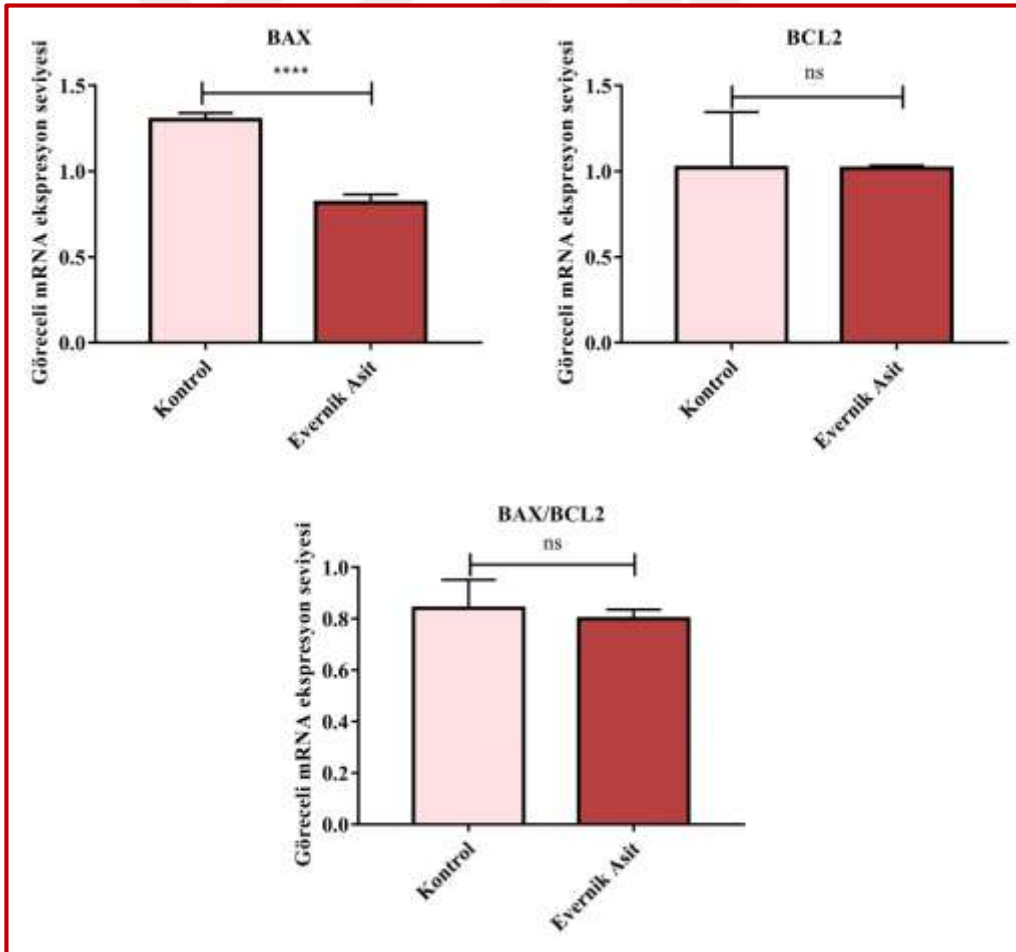
HepG2 kanser hücre hattında evernik asidin Tiyoredoksin (TXN), Tiyoredoksin Redüktaz 1 (TRXR1) ve apoptoz ilişkili genlerin (BAX, BCL2 ve P53) mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi

Evernik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde tiyoredoksin sistemin üyelerine ait TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişim, Şekil 48’de gösterilmiştir. Sonuçlara göre, istatistiksel olarak önemli bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).



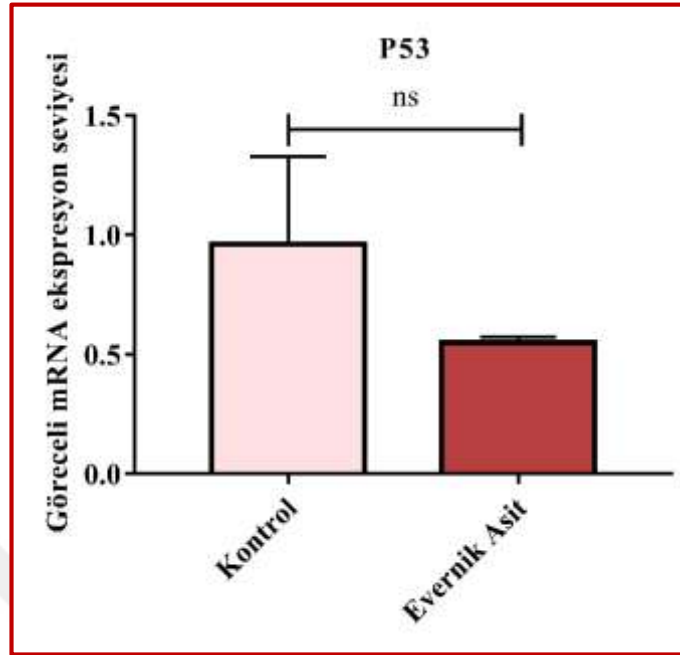
Şekil 48. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve evermik asit ile muamele grubunda TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları

BAX geninin mRNA ekspresyon seviyesinde yüksek derecede önemli bir azalışın olduğu ($p < 0,0001$) ve BCL2 geninin mRNA ekspresyon seviyesinde ise önemli bir değişikliğin olmadığı ($p > 0,05$), BAX/BCL2 oranında ise istatistiksel olarak önemli bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 49).



Şekil 49. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve evermik asit ile muamele grubunda BAX, BCL2 genlerinin ve BAX/BCL2 oranının mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları

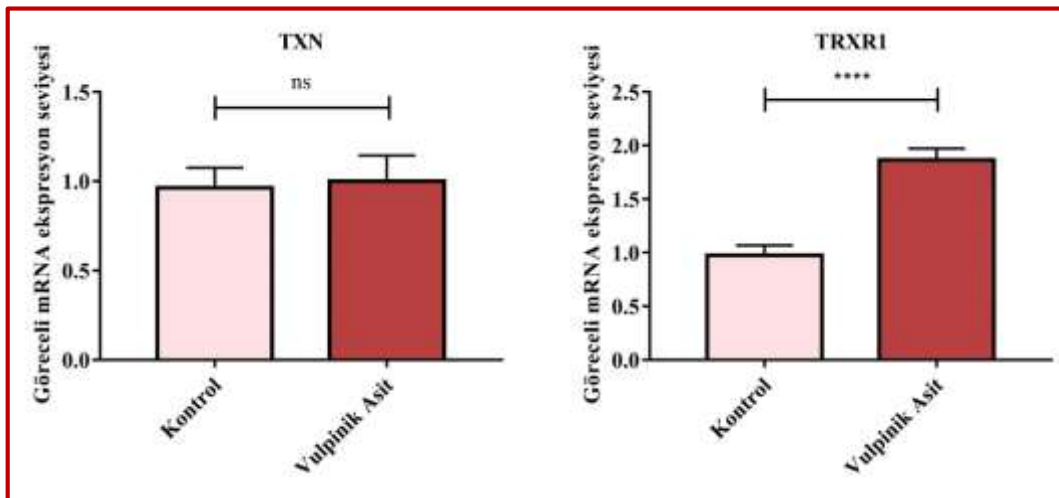
P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesinde ise istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 50).



Şekil 50. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve evernik asit ile muamele grubunda P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesine ait Real-Time PCR sonuçları

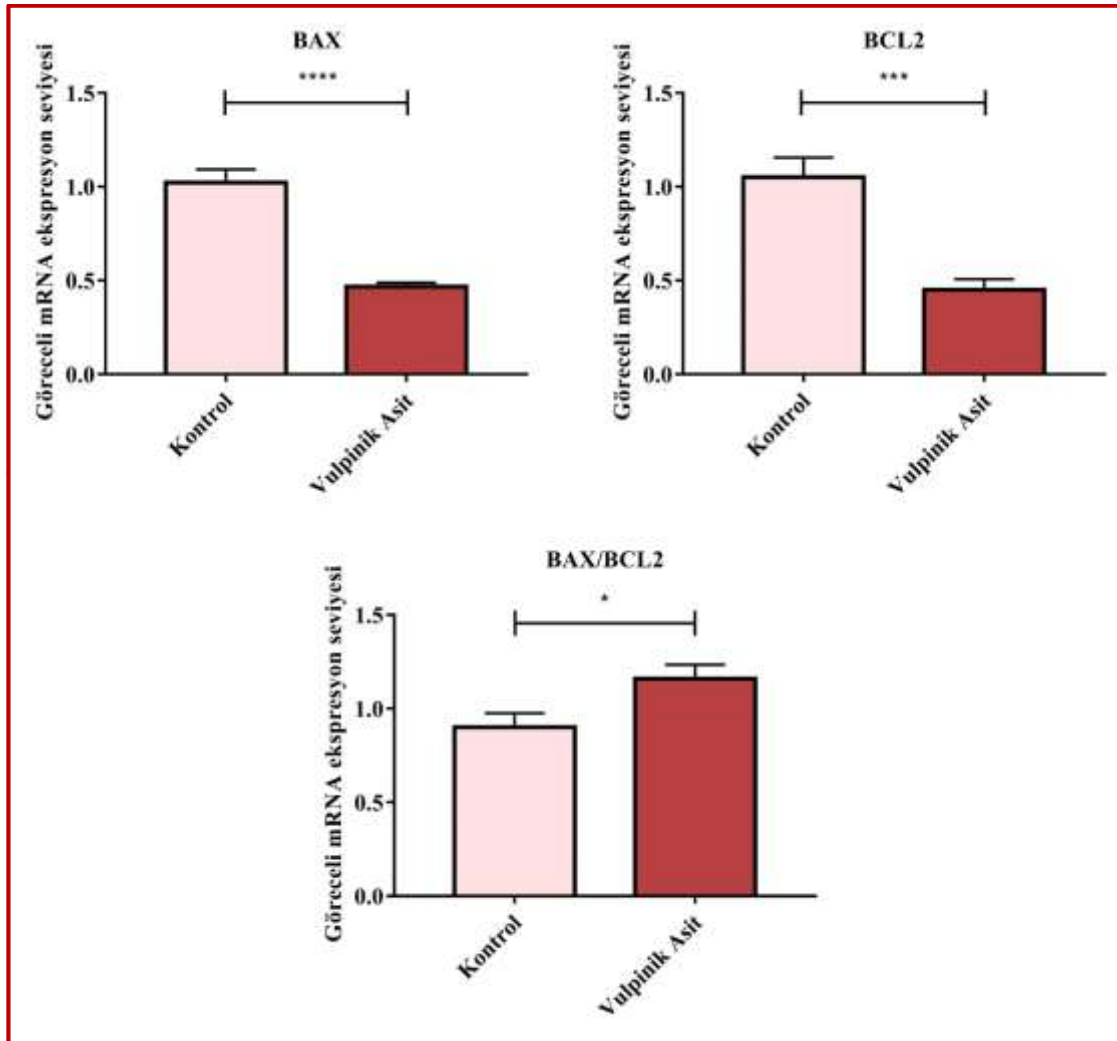
HepG2 kanser hücre hattında vulpinik asidin Tiyoredoksin (TXN), Tiyoredoksin Redüktaz 1 (TRXR1) ve apoptoz ilişkili genlerin (BAX, BCL2 ve P53) mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi

Vulpinik asidin muamelesi sonrasında HepG2 hücrelerinde TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişim, Şekil 51’de gösterilmiştir. Sonuçlara göre istatistiksel olarak TXN’nin mRNA ekspresyon seviyesinde önemli bir değişikliğin olmadığı ($p>0,05$), TRXR1’in mRNA ekspresyon seviyesinde ise yüksek derecede önemli bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,0001$).



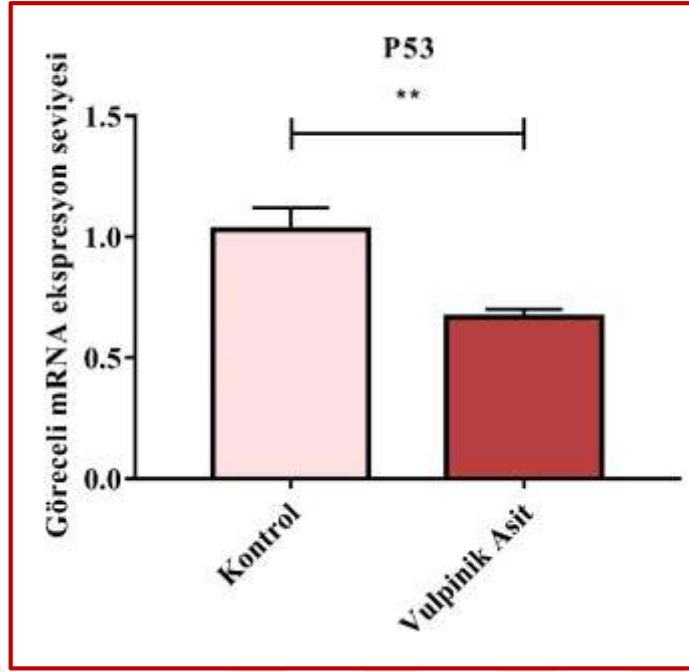
Şekil 51. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve vulpinik asit ile muamele grubunda TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları

Deney sonucuna göre istatistiksel olarak BAX ($p<0,0001$) ve BCL2 ($p<0,0005$) genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde yüksek derecede önemli bir azalış gözlenirken iki genin oranında (BAX/BCL2) önemli derecede bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 52).



Şekil 52. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve vulpinik asit ile muamele grubunda BAX, BCL2 genlerinin ve BAX/BCL2 oranının mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları

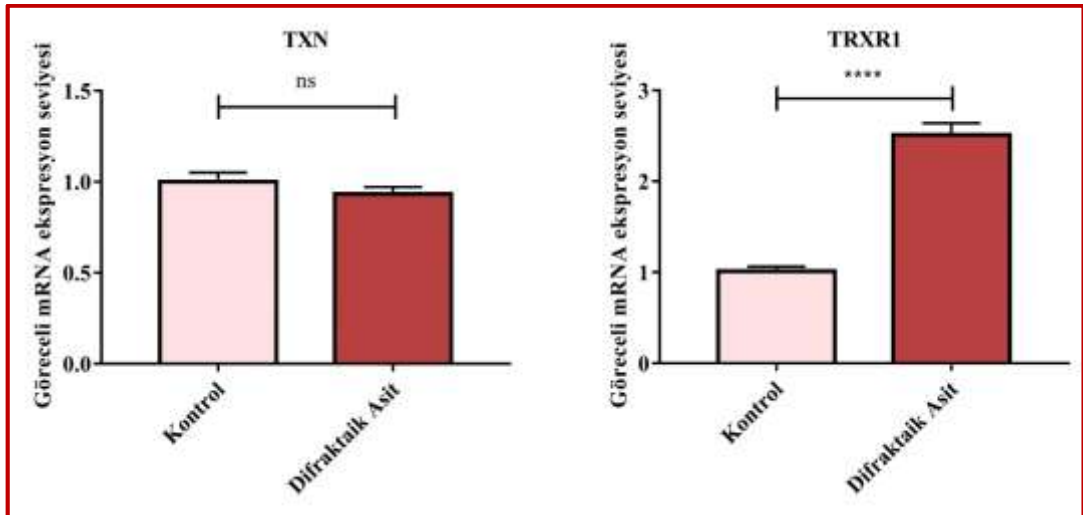
P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesinde ise çok önemli derecede azalış gözlenmiştir ($p<0,01$) (Şekil 53).



Şekil 53. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve vulpinik asit ile muamele grubunda P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesine ait Real-Time PCR sonuçları

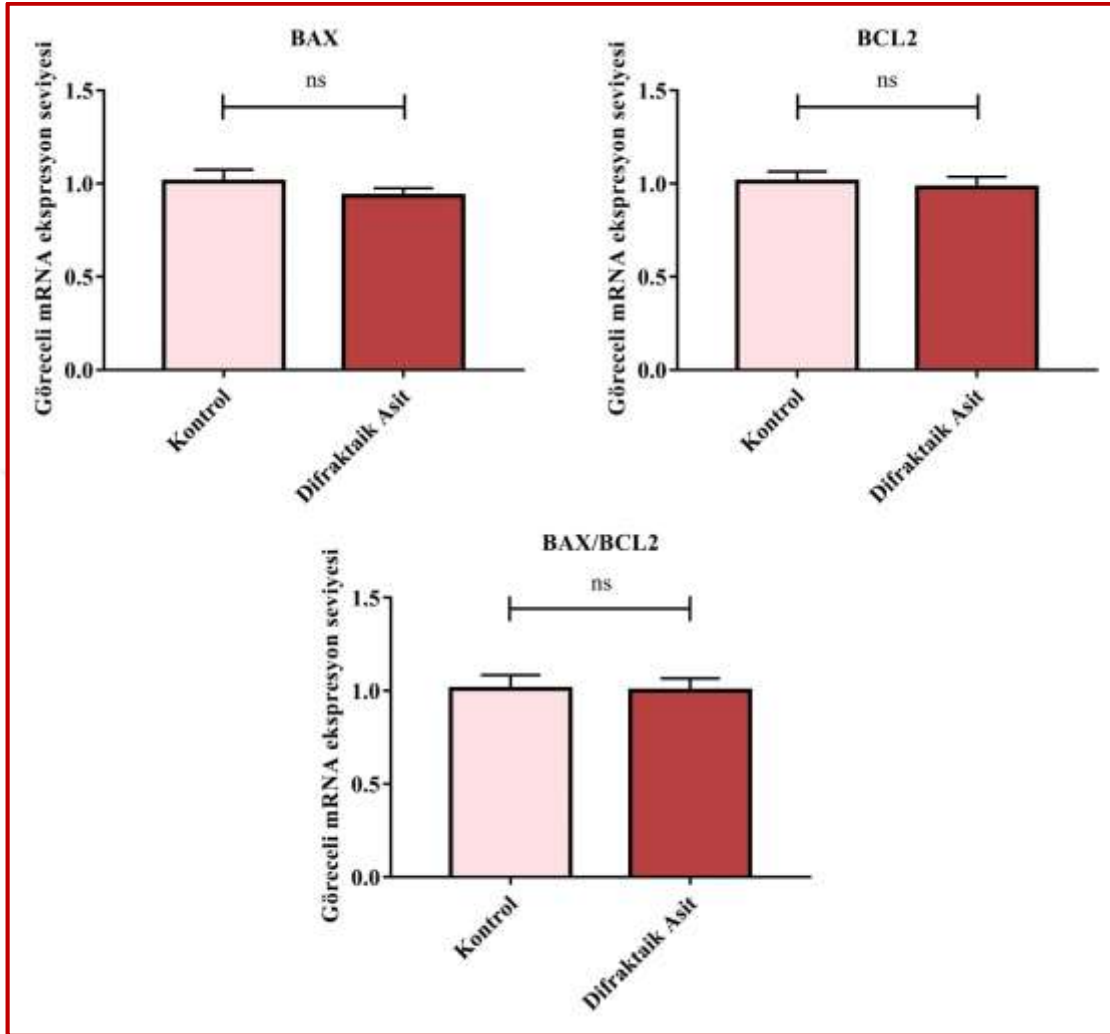
HepG2 kanser hücre hattında difraktaik asidin Tiyoredoksin (TXN), Tiyoredoksin Redüktaz 1 (TRXR1) ve apoptoz ilişkili genlerin (BAX, BCL2 ve P53) mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi

Difraktaik asit ile muamele sonrasında HepG2 hücrelerinde istatistiksel olarak TXN geninin mRNA ekspresyon seviyesinde önemli bir değişikliğin olmadığı ($p>0,05$), TRXR1 geninin mRNA ekspresyon seviyesinde ise yüksek derecede önemli bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 54).



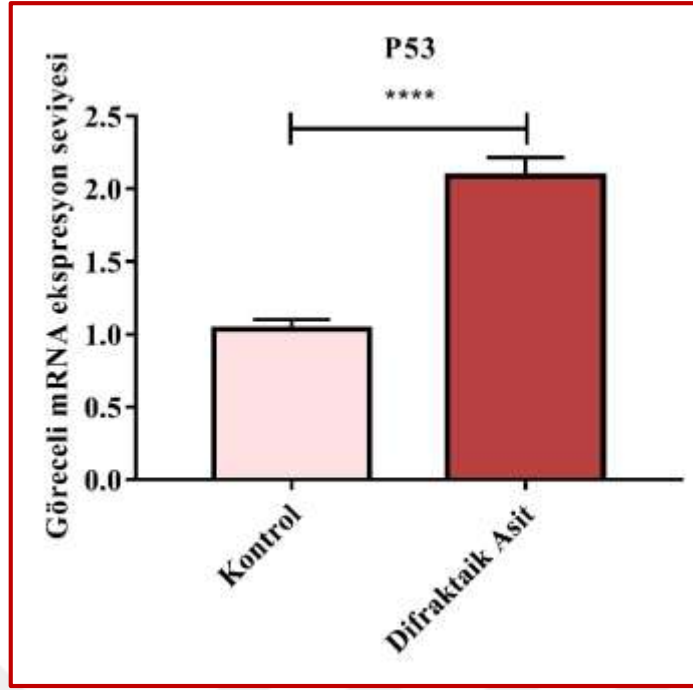
Şekil 54. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve difraktaik asit ile muamele grubunda TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları

Elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak BAX ve BCL2 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde ve BAX/BCL2 oranında önemli bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 55).



Şekil 55. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve difraktik asit ile muamele grubunda BAX, BCL2 genlerinin ve BAX/BCL2 oranının mRNA ekspresyon seviyelerine ait Real-Time PCR sonuçları

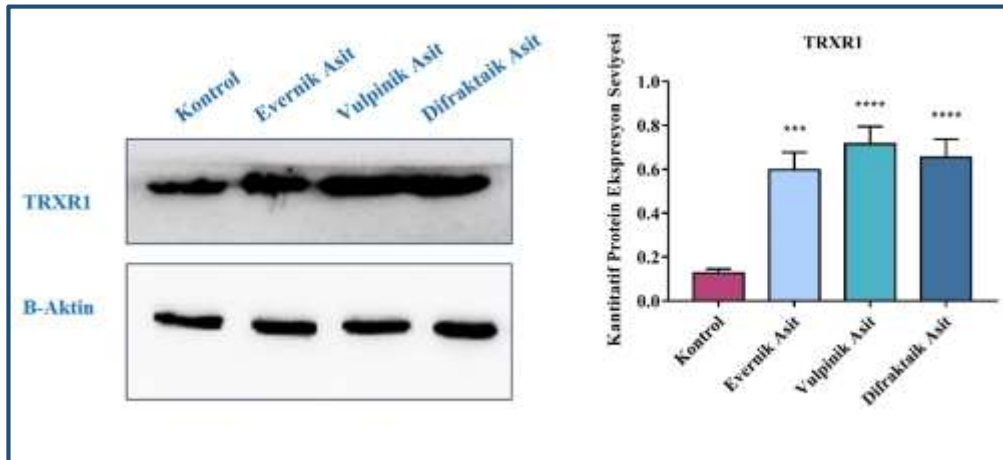
P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesinde ise yüksek derecede önemli artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 56).



Şekil 56. İnsan karaciğer (HepG2) hücre hattında kontrol ve difraktaik asit ile muamele grubunda P53 geninin mRNA ekspresyon seviyesine ait Real-Time PCR sonuçları

İnsan Karaciğer (HepG2) Kanseri Hücre Hattında Liken Asitlerinin Tiyoredoksin Redüktaz 1 Proteinin Kantitatif Ekspresyon Seviyesine Etkileri

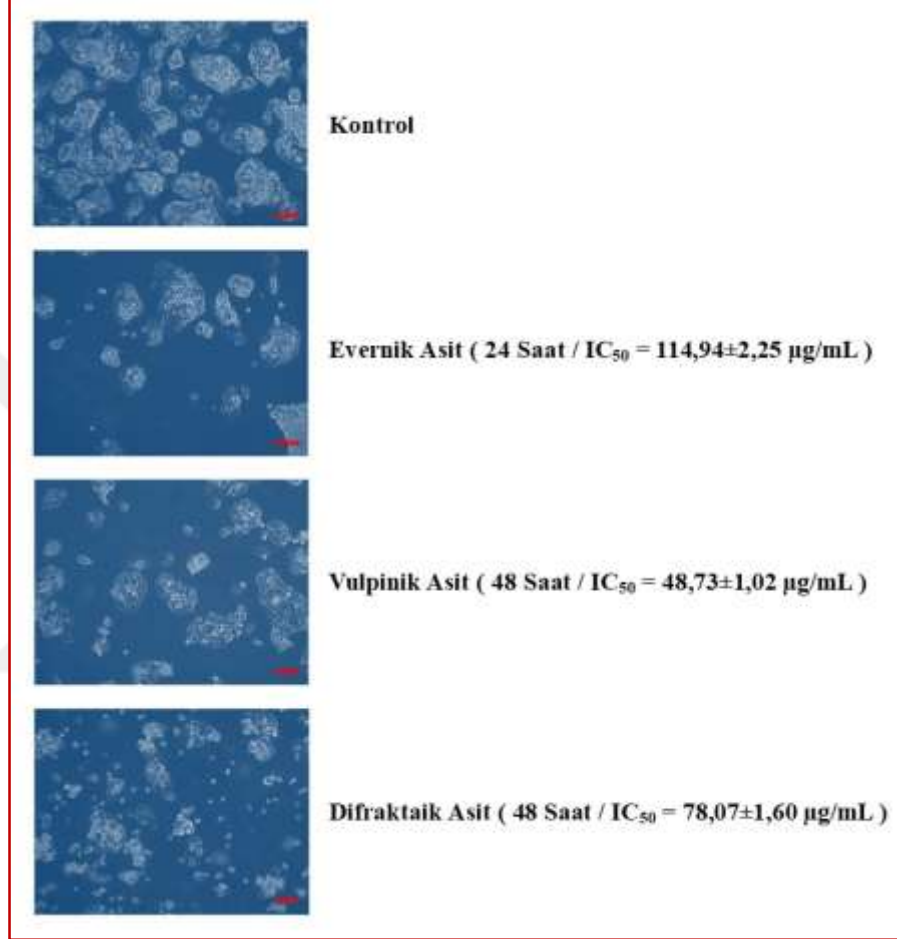
Tez kapsamında incelenen liken asitleri muamele edilmek üzere belirlenen inkübasyon saat dilimlerinde (24 veya 48 saat) ve IC_{50} değerlerinde (Tablo 14) HepG2 kanser hücrelerine uygulandıktan sonra elde edilen total protein hücre lizatlarında tiyoredoksin sistemine ait TRXR1 proteininin kantitatif ekspresyon seviyesindeki değişiklikler, Western blot yöntemiyle incelenmiştir. Deney sonucunda evernik ($p < 0,0005$), vulpinik ($p < 0,0001$) ve difrakatik asit ($p < 0,0001$) ile muamele edilen hücrelerde TRXR1' kantitatif protein ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak yüksek derecede önemli bir artışın olduğu gözlenmiştir (Şekil 57).



Şekil 57. Liken asitlerinin HepG2 kanser hücre hattında TRXR1'in kantitatif protein ekspresyon seviyesi üzerine etkisi

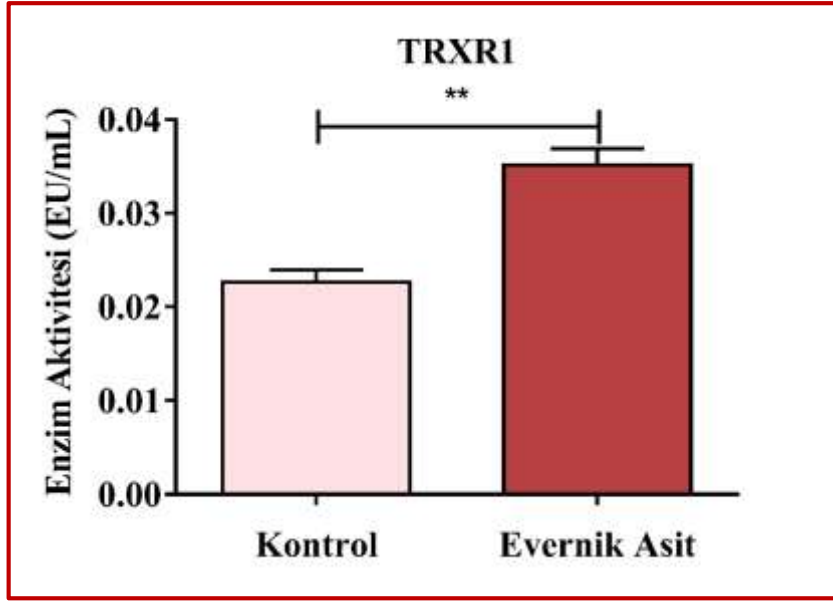
İnsan Karaciğer (HepG2) Kansere Hücresi Hattında Liken Asitlerinin Tioredoksin Redüktaz 1 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Evernik, vulpinik ve difraktaik liken asitleri insan karaciğer kanser (HepG2) hücre hatları ile belirlenen inkübasyon süresince ve IC_{50} değerlerinde muamele edildikten sonra invert mikroskopta görüntülenmiş (Şekil 58) ve TRXR1 enzim aktivitesindeki değişiklikler, DTNB yöntemi kullanılarak spektroskopik olarak ölçülmüştür.



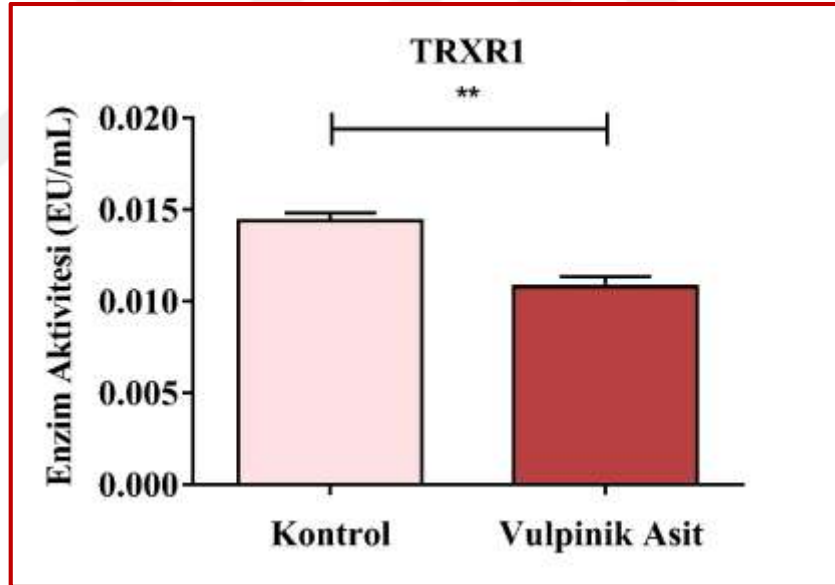
Şekil 58. Liken asitleri ile muamele edildikten sonra elde edilen HepG2 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (Ölçek boyutu: 50 μm)

Evernik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerindeki TRXR1 enzim aktivitesinde istatistiksel olarak çok önemli derece bir artış gözlenmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 59).



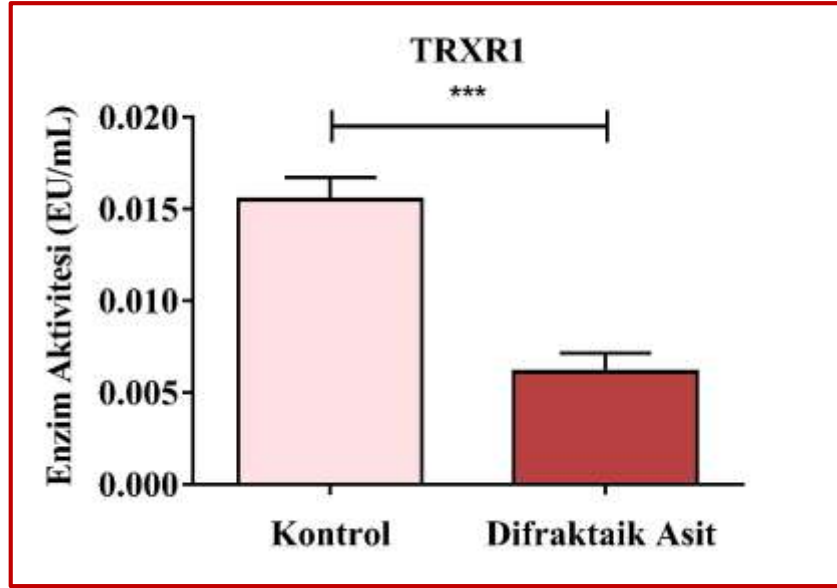
Şekil 59. Evernik asidin HepG2 kanser hücrelerinde TRXR1'in enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Vulpinik asit ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde ise TRXR1'in enzim aktivitesinde istatistiksel olarak çok önemli derece azalış saptanmıştır ($p < 0,01$) (Şekil 60).



Şekil 60. Vulpinik asidin HepG2 kanser hücrelerinde TRXR1'in enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Difraktaik asidinin HepG2 hücrelerinde TRXR1'in enzim aktivitesi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yüksek derecede önemli bir azalış olduğu gözlenmiştir ($p < 0,0005$) (Şekil 61).



Şekil 61. Difraktaik asidin HepG2 kanser hücrelerinde TRXR1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Tartışma ve Sonuç

Kanser, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasına yol açan gen ve protein ekspresyonundaki çoklu değişikliklerin neden olması sonucunda hücrelerin kontrolsüz ve anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması ile ortaya çıkan çoğunlukla ölümcül bir hastalıktır (Ruddon 2007). Farklı fenotipik özelliklere (kanser başlangıç yaşı, büyüme hızı, hücresel farklılaşma durumu, tanısal tespit edilebilirlik, tedavi ve prognoz cevabı vb.) sahip büyük bir grubu kapsayan bu hastalık insanın bağışıklık sistemini bozması, apoptoza direnç göstermesi, metastaz yapması, evrimleşmesi, invazif karakter sergilemesi, dokuları tahrip etmesi ve ilaçlara direnç göstermesi gibi pek çok ortak özellik içerir (Mukherjee 2010).

Primer karaciğer kanserinin %90'ından fazlasını temsil eden hepatoselüler karsinom (HCC) en sık görülen malign tümörlerden biridir ve kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır (Cheng *et al.* 2016). HCC için 5 yıllık sağkalım oranı %9'dan daha az olup hastaların %5'inden fazlası, 2 yıldan fazla hayatta kalamamaktadır (Luo *et al.* 2017). Dünya genelinde 2020 yılında tahminen 906.000 yeni karaciğer kanseri vakası ve bundan dolayı 830.000 ölüm meydana gelmiştir ve HCC insidansı çarpıcı bir şekilde artmaktadır (Sung *et al.* 2021).

HCC, özellikle Hepatit B ve C virüsleri ile kronik enfeksiyonlara bağlı olarak kronik karaciğer hastalığı ve siroz zemininden gelişim göstermekte ve alkol tüketimi, bazı ilaçlar ve toksik madde maruziyeti ve genetik metabolik hastalıklar da bu kanser türünün etiyolojisine katılmaktadır (D'souza *et al.* 2020). Ayrıca birçok çalışmada HCC'nin patofizyolojisinde hem oksidatif stres temellerinin yattığı hem de inflamasyon mekanizmalarının rol oynadığı bilinmektedir. Kanser orijinlendiği bir doku veya organdan kanser hücrelerinin ayrılarak kan ve lenf yoluyla başka doku ve organlara yayılımı ifade eden metastaz yeteneği, neredeyse tüm kanser türlerinde görülen özelliklerden biridir. HCC'nin de bu grupta yer aldığı ve yüksek nüks etme oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir (Chabner *et al.* 2013).

HCC cerrahi rezeksiyon, ortotopik karaciğer transplantasyonu (OKT), hepatik arterin kimyasal embolizasyonu, tümör içine etanol enjeksiyonu ve radyofrekans ablasyon gibi yöntemlerle tedavi edilebilir (Au *et al.* 2015). Ancak bu tedavi yöntemlerinin iyileştirici yönde değil de sağkalımın uzatılması için uygulandığı bilinmektedir. HCC tedavisinde sistemik kemoterapi ve radyoterapinin başarısı ise sınırlıdır. Ayrıca HCC'nin çoklu ilaç direnç geni

MDR-1'e sahip olması kemoterapötik yaklaşımları kısıtlamakta ve etkin ajanların geliştirilmesi için birçok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Wilson *et al.* 2012).

Bilindiği üzere kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek amacıyla antikanser ilaçlarının kullanıldığı işlem sürecini kapsayan bir tedavi yöntemidir. Bu zamana kadar birçok kemoterapötik ilacının kullanımı, tedavi etme yönünde başarının yanında bazı toksik yan etkileri de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, kemoterapinin bu yan etkilerini azaltacak, kanser hücrelerine spesifik, güvenilir ve oldukça etkili antikanser ajanlarının belirlenmesi için yeni kemoterapötik stratejilerin geliştirilmesi ilgi odağı haline gelmiştir (Pearce *et al.* 2017). Günümüzde kullanılan antikanser ilaçların da %60'ından fazlasının doğal kaynaklardan elde edilen ürünler olduğu bildirilmiştir (Mondal *et al.* 2012). Bu yönde araştırılmak üzere birçok doğal ürünün olmasıyla birlikte bunların antikanser ajanı olarak kullanılabilirliği incelenmekte ve bu yönde yapılan çalışmalar sonucunda likenlerden elde edilen sekonder metabolitler olan liken asitlerinin kemoterapötik ajan olarak etkili olabileceği düşünülmüştür. Ancak bu alanda sınırlı sayıda çalışmanın mevcut olduğu görülmektedir (Ozgencli *et al.* 2018; Shrestha *et al.* 2015).

Bu tez kapsamında incelenen dört liken asidinden (evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik) lekanorik asit hariç diğerlerinin doz ve zamana bağlı olarak insan karaciğer kanser hücre hattı olan HepG2 için etkili antiproliferatif etki göstererek antikanser etkisinin olduğu belirlenmiştir. Sonuçlara göre en yüksek antiproliferatif etkiye sahip olan liken asidinden en düşük antiproliferatif etkiye sahip olan liken asidine doğru sıralanışın vulpinik asit ($IC_{50}=48,73\pm1,02 \mu\text{g/mL}$, 48 saat), difraktaik asit ($IC_{50}=78,07\pm1,60 \mu\text{g/mL}$, 48 saat) ve evernik asit ($IC_{50}=114,94\pm2,25 \mu\text{g/mL}$, 24 saat) olduğu saptanmış ve kemoterapötik ajan olarak bu üç liken asidinin kullanılabilir olacağı kanısına varılmıştır. Lekanorik asidin ($IC_{50}>250 \mu\text{g/mL}$, 24 saat) ise antiproliferatif etki göstermediği ve kemoterapötik ajan olarak kullanılabilir olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışma ile evernik asidin HepG2 kanser hücre hattında hücre proliferasyonunu %50 azaltmak için gereken konsantrasyon (IC_{50}) değerinin $114,94\pm2,25 \mu\text{g/mL}$ olduğu ve etkin inkübasyon süresinin ise 24 saat olduğu belirlenmiştir. Evernik asidin 48 saatlik inkübasyon süresine kıyasla 24 saatlik inkübasyon süresinde daha düşük IC_{50} değerinde hücrelere etki göstermesi, inkübasyon süresi arttıkça evernik asidin HepG2 kanser hücreleri üzerindeki etkinliğinin düşmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Evernik asidin bu düşük antiproliferatif etkisi ise Aoussar ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada gözlenmiş olup çeşitli likenlerden elde edilen aseton ekstraktlarının içerisinde biyoaktif bileşik olarak bulunan evernik asidin HepG2 kanser hücre hattı için önemli sitotoksik etki

göstermemesi bu sonucu desteklemektedir (Aoussar *et al.* 2020). Ayrıca başka bir çalışmada MM98 malign mezotelyoma, A431 vulvar karsinom ve HaCaT keratinositlerinde, hücre proliferasyonuna karşı evernik asidin düşük toksisite gösterdiği ve yapılan yara iyileştirme etkilerinin ise az olduğu bildirilmiştir (Žugić *et al.* 2018). Bu tez kapsamında da incelenen liken asitlerinin HepG2 hücrelerinin metastaz yapabilmesini etkileyip etkilemeyeceği yara izi (wound healing assay) deneyi ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre 12. saat diliminin sonunda evernik asidin yara alanında bir değişiklik oluşturmuyarak migrasyonu engelleme yönünde bir etki göstermediği, 24. saat diliminin sonunda da önemli derecede migrasyonu engellediği görülmüştür. 48. ve 72. saat dilimlerinin sonunda ise yüksek migrasyon engelleyici etki gösterdiği saptanmıştır.

Tüm kanser türlerinde ortak bir özellik olarak kanser hücrelerinin apoptoza karşı direnç geliştirerek hayatına devam ettiği ve proliferasyonunu sürdürdüğü bilinmektedir. Bu tez çalışmasında evernik, vulpinik ve difraktaik asitlerin HepG2 kanser hücrelerine karşı gösterdikleri antiproliferatif etkilerin, kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilerek mi gerçekleştiğine dair yapılan flow sitometrik analiz sonuçları, hücrelerde apoptoz ile ilişkili olan BAX, BCL2 ve P53 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine de bakılarak değerlendirilmiştir. Evernik asit için flow sitometrik sonuçlarına göre HepG2 kanser hücre hattı üzerinde düşük derecede bir apoptotik etki sergilediği, kanser hücre hattını apoptoza yönlendirdiğinin bir göstergesi olan BAX/BCL2 oranını ve P53 genin mRNA ekspresyon seviyesini de değiştirmedeği gözlenmiştir. Kantitatif mRNA ekspresyon seviye analizi ile flow sitometrik sonuçlarının birbiri ile tutarlı olduğu görülmektedir. Evernik asidin saptanan antiproliferatif etkisinin altında yatan mekanizmaları açıklayan bir çalışma mevcut olmayıp bu tez çalışmasında yapılan incelemeler sonucunda bu liken asidinin HepG2 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin, apoptoz üzerinden gelişmediği ve farklı hücresel olaylarla ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır.

Kılıç ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada, vulpinik asidin kanser hücre hatları (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD Wehi) ve normal hücreler (Vero ve L929) üzerindeki sitotoksik etkileri incelenerek vulpinik asidin apoptotik etkisi araştırılmıştır. MTT analizi sonucunda HepG2 için IC₅₀ konsantrasyon değerinin 23,8 µM olduğu ve 48 saat muamelenin etkin süre olduğu belirlenmiştir (Kılıç *et al.* 2018). Bu tez kapsamında elde edilen veriler doğrultusunda HepG2 kanser hücre hattında vulpinik asidinin etkin inkübasyon süresinin ise 48 saat olduğu ve 48,73±1,02 µg/mL IC₅₀ konsantrasyon değeri ile kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca bu liken asidinin HepG2 kanser hücrelerinde migrasyonu engelleyici etkileri incelenmiş ve 12. saatte önemli derecede, 24. saatte çok önemli

derecede, 48 ve 72. saatlerde ise yüksek derecede migrasyonu engelleyerek bu üç liken asidi arasında migrasyonu inhibe eden en etkili liken asidinin vulpinik asit olduğu belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada *Pulveroboletus ravenelii* isimli bir mantardan elde edilen metanol ekstraktın HepG2 kanser hücre hattının da dahil olduğu 7 kanser hücre hattında *in vitro* sitotoksik etkileri incelenmiş olup ekstraktın en etkili fraksiyonunun ana bileşeninin vulpinik asit olduğu saptanmış ve yapılan çalışmanın sonuçlarına göre vulpinik asidin 48 saatlik uygulamasında HepG2 kanser hücrelerinde $60,35 \pm 4,18 \mu\text{M}$ arasında IC_{50} değeri ile sitotoksik aktivite sergilediği belirtilmiştir. Ayrıca vulpinik asidin HepG2 kanser hücreleri üzerinde saptanan antiproliferatif etkilerini apoptozu indükleyerek gerçekleştirdiği, TUNEL testi ve PARP'ın bölünmüş seviyesindeki artışının gözlemlendiği Western blot yöntemi ile tespit edilmiştir (Kim *et al.* 2017). Bu tez çalışmasının sonucunda flow sitometrik analiz verilerine göre vulpinik asidin HepG2 kanser hücre hattı için yüksek oranda geç apoptoza yönlendirmesiyle antiproliferatif aktivite sergilediği belirlenmiştir.

Vulpinik asidin kanser hücrelerini apoptoza yönlendirerek hücre proliferasyonunu etkilediğini gen mRNA ekspresyon seviyesinde inceleyen bir çalışmada da, vulpinik asidin sitotoksik ve apoptotik etkisi, aralarında HepG2 kanser hücre hattının da olduğu kanser hücre hatlarında (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD Wehi) ve normal hücrelerde (Vero and L929) incelendiğinde ve tüm kanser hücrelerinde BAX, BCL2 ve P53 genlerinin mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında, BAX geninin BCL2 ve P53 genlerine kıyasla daha fazla ekspresyon artışı gösterdiği gözlenmiştir (Kılıç *et al.* 2018). Bu sonuçlarla doğru orantılı olarak bu tez çalışması kapsamında vulpinik asidin HepG2 kanser hücre hattını apoptoza yönlendirdiğinin bir göstergesi olan BAX/BCL2 oranının önemli derecede arttığı, P53 gen mRNA ekspresyon seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir.

Çeşitli likenlerden izole edilen difraktaik asidin sitotoksik etkisinin incelendiği iki ayrı çalışmada, Brandão ve arkadaşları (2012) tarafından UACC-62 ve B16-F10 melanom hücrelerine karşı difraktaik asidin orta derecede sitotoksik olduğu ve Truong ve arkadaşları (2014) tarafından HeLa (insan epitelyal karsinomu), NCI-H460 (insan akciğer kanseri) ve MCF-7 (insan meme kanseri) hücre hatlarına karşı difraktaik asidin güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Brandão *et al.* 2012; Truong *et al.* 2014). Bu tez kapsamında HepG2 kanser hücre hattına karşı IC_{50} değerinin $78,07 \pm 1,60 \mu\text{g/mL}$ olduğu ve etkin inkübasyon süresinin ise 48 saat olduğu difraktaik asidin antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Difraktaik asidin HepG2 hücrelerindeki migrasyonu engelleyici etkisi incelendiğinde ise 12. saat sonunda migrasyonu engelleme yönünde bir etki göstermediği, 24. saat sonunda önemli

derecede migrasyonu engellediği, 48. ve 72. saat sonunda ise yüksek migrasyon engelleyici etki gösterdiği saptanmıştır.

Diğer yandan, difraktaik asidin flow sitometrik analiz verilerine göre HepG2 kanser hücreleri üzerinde yüksek oranda geç apoptoza yönlendirerek antiproliferatif aktivite sergilediği saptanmıştır. Ayrıca incelenen difraktaik asidin BAX/BCL2 oranını HepG2 kanser hücre hattında değiştirmedeği, P53 gen ekspresyonunu ise önemli derecede arttırdığı gösterilmiş ve bu artış ile apoptozun indüklendiği, gen ekspresyon seviyesinde de gösterilmiştir. Bu sonuçları destekleyen bir çalışmada difraktaik asidin A549 ve AGS kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri incelendiğinde Topo II α geninin ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak proliferasyonu inhibe ettiği, CASP3 ve P53 genlerinin ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Kızıl & Açar 2017).

Bu çalışmada lekanorik asidin HepG2 kanser hücre hattı üzerine 24 saatlik uygulamasında 250 $\mu\text{g/mL}$ 'e kadar antiproliferatif etki sergilemediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar lekanorik asidin uygun bir kemoterapötik ajan olmayacağı yönündedir. Aynı şekilde başka bir tez çalışmasında da incelenen lekanorik asidin A549 akciğer kanser hücre hattına karşı hücre canlılığı üzerine beklenen şekilde bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Kızıl 2016). Paluszczak ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan bir başka çalışmada da HCT116 ve DLD-1 kolorektal kanser hücre hatlarında hücrelerin hayatta kalmasını, proliferasyonunu ve metastazını indüklediği bilinen Wnt sinyal yolu üzerindeki anormal olan β -katenin'in yüksek transkripsiyonel aktivitesi incelenmiş ve lekanorik asidin β -katenin hedef geninin (*Axin2*) ekspresyonunu hafifçe azalttığı buna bağlı olarak da etkili bir şekilde hücre proliferasyonunda azalış olmadığı bildirilmiştir (Paluszczak *et al.* 2018).

HCC'nin tanısı zor olmakla beraber tanı süreci, serum belirteçlerine bakmayı, bir ya da daha fazla görüntüleme yönteminin kullanılmasını ve histolojik doğrulamayı gerektirmektedir ve tümör evresi ve hasta etiyolojisi dikkate alındığında hem HCC tespitinde hem de sirozdan ayırmada yüksek tanı gücü gösteren biyobelirteçler en umut verici olanlardır. Buna yönelik gerçekleştirilen çalışmalardan birisinde de çok erken HCC (<2 cm) için Anneksin A2, reseptör tirozin kinaz Axl'nin çözünür formu (sAxl) ve tiyoredoksinin (TXN1) tanısal kullanılabilirliğinin AFP ile kıyaslamalı değerlendirilmesi sonucunda yeni tanısal serum biyobelirteçleri olarak sırasıyla sAxl, TXN1 ve Anneksin A2'nin kullanılabileceği bildirilmiştir (Reichl & Mikulits 2016). Tiyoredoksin sistemin üyelerinden biri olan TXN1'in çeşitli kanserlerde ekspresyon seviyelerinin arttığı bilinmektedir. Ayrıca TRX sisteminin üyelerinden olan TRXR1'in de meme, serviks, akciğer, karaciğer ve mide kanseri gibi birçok agresif tümör hücrelerinde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Branco *et al.* 2014; Jia *et al.* 2019; Ouyang *et al.*

2018). Bu sonuçlara göre TXN1'i ve onun hücredeki indirgenme düzeyini düzenleyen TRXR1'i hedefleyebilen kemoterapötik stratejilerin geliştirilmesi kanser tedavileri için umut olabileceği kanısına varılmıştır. Ozgencli ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada bazı antikanser ajanlarının fare karaciğerlerinden izole edilen mitokondriyal TRXR (TRXR2) enzimi üzerine hepsinin ve sitozolik GST enzimi üzerine ise sadece birinin *in vitro* inhibisyon etkisinin olması antikanser ajanlarının TRXR'yi hedefleyebileceği kanısını destekleyici niteliktedir (Ozgencli *et al.* 2018).

Ozgencli ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan başka bir çalışmada da sıçan akciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TRXR enzimi üzerine difraktaik, evernik, lobarik, lekanorik ve vulpinik asidin etkileri incelenmiş ve sisplatin ve doksorubisin antikanser ajanlarına kıyasla özellikle lekanorik ve vulpinik asit olmak üzere araştırılan liken asitlerinin TRXR2 enzimine karşı güçlü inhibisyon etkilerinin olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir (Ozgencli *et al.* 2018). Ancak hiçbir çalışmada bu liken asitlerinin insan kanser hücrelerinde tiyoredoksin sistem üyelerinden olan TXN1 ve TRXR1 üzerine etkileri incelenmemiştir. Bu tez kapsamında da liken asitlerinin tiyoredoksin sistem (Trx) üyelerinden olan TXN1 ve TRXR1 üzerine etkileri bu genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri ve TRXR'nin kantitatif protein miktarı ile enzim aktivitesi incelenerek bu liken asitlerinin göstermiş oldukları antikanser etkilerin tiyoredoksin sisteme ait TRXR1 üzerinden gelişip gelişmediği araştırılmıştır.

Bu tez çalışması sonucunda evernik asit ile muamele edilen hücrelerde kantitatif protein miktarında yüksek derecede önemli bir artışın olmasına rağmen, TRXR1'in gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişimin olmadığı saptanmıştır. Ayrıca TXN1 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişimin olmadığı bulunmuştur. HepG2 kanser hücre hattında TRXR1 enzimi üzerine etkileri incelendiğinde ise evernik asidin enzim aktivitesini önemli derecede arttırdığı görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen tüm sonuçlara göre hücrelerin apoptoza da gitmiyor olması, evernik asidin hücreler üzerindeki antiproliferatif etkisinin bu yolak üzerinden gerçekleşmediğini göstermektedir.

Bu tez kapsamında incelenen vulpinik ve difraktaik asit ile muamele edilen HepG2 kanser hücre hattında TRXR1'in kantitatif protein ekspresyon analizi ile doğru orantılı olacak şekilde TRXR1 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinde yüksek derecede önemli bir artışın olduğu gözlenmiştir. Ancak bu iki liken asidinin muamelesi sonucunda hücrelerde TXN1 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişimin olmadığı saptanmıştır. Ayrıca bu liken asitlerinden her ikisinin de HepG2 kanser hücrelerindeki TRXR1 enzim aktivitesi üzerinde önemli derecede inhibe edici etkisinin olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara

göre vulpinik ve difraktaik asidin HepG2 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerinin, TRXR1'in inhibisyonu üzerinden geliştiğini düşündürmektedir.

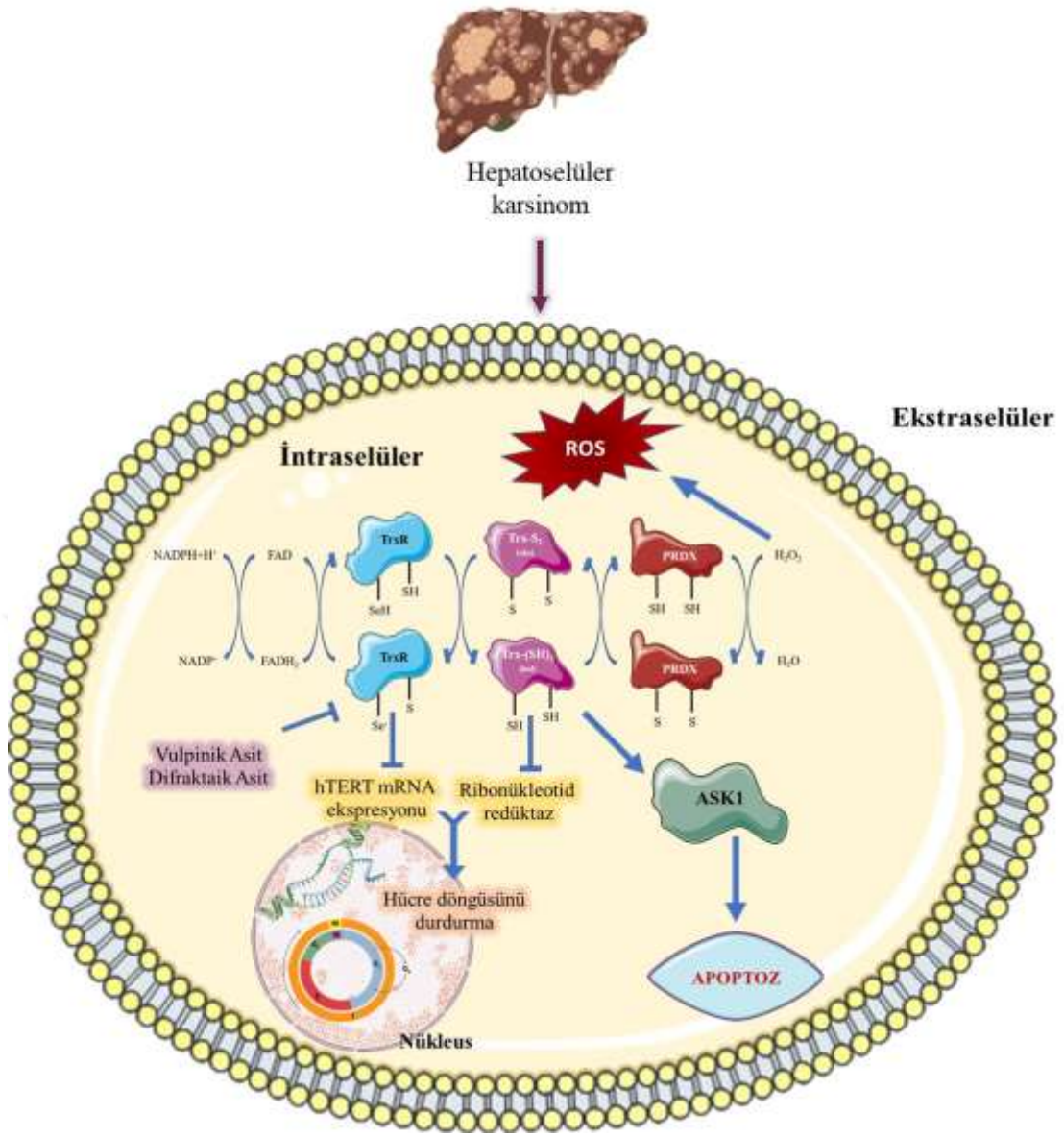
TXN1'in redoks aktif bölgelerinin özellikle 62, 69 ve 73. konumlarındaki üç Cys rezidüleri, TXN1'in posttranslasyonel modifikasyonu için oldukça önemlidir. Bu rezidülerin, özellikle glutatyonilasyon olmak üzere tiyol oksidasyonu ve S-nitrosilasyon gibi çeşitli mekanizmalarla etkileşimi TXN1'in aktivitesini düzenler (Harris & DeNicola 2020; Sumbayev & biophysics 2003). Bilindiği üzere TXN1, ribonükleotid redüktazın indirgenmesi için bir hidrojen donörü olarak davranmaktadır. Bunun sonucunda ribonükleotid redüktaz, DNA sentezi ve onarımı için gerekli olan deoksiribonükleotitlerin sentezini gerçekleştirecektir (Muri *et al.* 2018). Kanser hücrelerinde ise artan hücre proliferasyonu ile sürekli DNA sentezi gerçekleşmektedir. Bu yüzden posttranslasyonel modifikasyonlar gibi süreçlerle ortaya çıkabilecek olan TXN1'in inhibisyonunun, deoksiribonükleotitlerin sentezini engellemesiyle kanser hücreleri üzerinde hücre çoğalmasını durdurarak antiproliferatif etki oluşturacağı kanısına varılmıştır. Ayrıca bilindiği üzere kanser hücrelerinin sınırsız çoğalmak için aşırı telomeraz aktivitesine ihtiyacı vardır. Bir çalışmada TRXR'nin antisens yaklaşımı ile inhibisyonunun hepatoselüler karsinom SMMC-7721 hücrelerinde büyümeyi baskıladığı ve TRXR'nin mRNA ekspresyon seviyesini ve enzim aktivitesini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca G2/M fazında hücre döngüsü birikimi olduğu, P53 mRNA ekspresyon seviyesinde bir artışın olduğu ve BCL2, insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT) mRNA ekspresyon seviyelerinde ise bir azalış ile hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (Gan *et al.* 2005). Bu bilgiler doğrultusunda, hem TXN1'in hem de TRXR'nin inhibisyonu ile hücre döngüsü durdurularak hücre çoğalmasının engellenebileceği ve Trx antioksidan savunma mekanizmasının çalışmaması ile hücrede H_2O_2 'nin birikimiyle artan ROS ile apoptozun indüklenebileceği çıkarımı yapılabilir.

TXN1'in indirgenmiş hali, apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1'e (ASK1) bağlanarak ASK1'in aktivitesini inhibe etmesi sonucunda apoptozu baskılayabilir ve böylece kanser hücrelerinde artan TRXR1 etkisi ile sürekli indirgenmiş formda bulunan TXN1, ASK1'in inhibisyonunu sağlayarak apoptoza karşı direnç oluşturmaktadır (Arner & Holmgren 2006). Bu bilgiler doğrultusunda TRXR1'in inhibisyonunun gerçekleşmesi sonucunda sitoplazmada indirgenmiş formdaki TXN1'in normal hücrelerdeki seviyesine ulaşması ve hücrelerde apoptozun tetikleneceği fikrini ortaya koymaktadır. Yoo ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan çalışmada TRXR1'e yönelik siRNA'nın akciğer kanseri hücrelerine transfekte edilmesinin ardından hücrelerin tümör morfolojilerini büyük ölçüde tersine çevirmesi ve

normal hücrelere benzer şekilde geri dönen büyüme özellikleri göstermesi bu fikri desteklemektedir (Yoo *et al.* 2006).

TRXR, ikinci redoks aktif merkezlerinde selenosisteini (Sec) barındırmasından dolayı selenoenzim olarak da anılır. Selenyum, hücre fonksiyonları için gerekli olan miktarı çok dar bir aralıkta olsa bile hücrel redoks işlemlerinde merkezi rol oynayan önemli bir oligo elementtir ve sayısız kronik hastalık ve kanserin önlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. TRXR1, yüksek düzeyde erişilebilir ve çok reaktif nükleofilik Sec rezidüsünün hedeflenmesi yoluyla çok çeşitli küçük bileşikler, özellikle metal bileşikler veya Michael alıcıları gibi elektrofiller tarafından inhibe edilir ve böylece kovalent olarak türevlenir (Zhang *et al.* 2017). TRXR1'in inhibisyonunun, ayrıca antikanser etkileri olan birçok farklı elektrofil ile meydana geldiği gösterilmiştir (Arnér 2017). Bu tez çalışmasında kullanılan vulpinik ve difraktaik asitlerinin, TRXR1'in Sec rezidüleri ile kimyasal etkileşimleri üzerine oluşturabileceği selenit gibi organoselenyum yapılarla TRXR1 enzimini inhibe ettiğini düşündürmektedir (Björnstedt *et al.* 1992; Jönsson-Videsäter *et al.* 2004; Kumar *et al.* 1992).

Sheth ve arkadaşları (2006) tarafından HCC fare modelleriyle yapılan bir çalışmada, TXNIP yokluğunda AFP ve P53 seviyelerinin arttığı ve farelerde kanser gelişiminin meydana geldiği gösterilmiştir (Sheth *et al.* 2006). TXN1'in aktivitesinin ve ekspresyonunun, TXN1'in negatif düzenleyicisi olan TXNIP tarafından TXN1'in aktif merkezi ile etkileşime girmesiyle kontrol edildiği bilinmektedir. TXNIP'in ekspresyonundaki artış nedeniyle kanserlerde artan TXN1'in inhibisyonu sayesinde apoptozun indüklenmesi, kanser için umut verici bir tedavi yöntemi olabilir. Bu yüzden bu liken asitlerinin HepG2 kanser hücre hattı üzerinde Trx sistem üyelerinden biri olan TXNIP'in gen ve protein seviyesinde etkileri incelenerek bu liken asitlerinin antiproliferatif etkilerinde Trx sisteminin rolü, bir bütün halinde değerlendirilebilir.



Şekil 62. Hepatoselüler karsinom hücrelerinde tioredoksin redüktaz 1'in vulpinik ve difraktaik asit tarafından inhibisyonunun hücredeki çeşitli yollar üzerine etkisinin şematize edilmesi

Sonuç ve Öneriler

1. Evernik, vulpinik, difraktaik ve lekanorik asitlerle muamele edilen insan karaciğer (HepG2) kanser hücre hattında yapılan *in vitro* sitotoksik analizler sonucunda lekanorik asit hariç, diğer üç liken asidinin (evernik, vulpinik ve difraktaik asit) hücreler üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir.
2. En yüksek antiproliferatif etkiyi vulpinik asit 48 saatlik inkübasyon süresinde gösterirken, en düşük antiproliferatif etkiyi evernik asit 24 saatlik inkübasyon süresinde göstermiştir. Difraktaik asidin ise antiproliferatif etkisini 48 saatlik inkübasyon süresinde gösterdiği saptanmıştır.

3. Evernik asidin en etkili inkübasyon süresi olan 24 saatlik bekleme süresi sonunda HepG2 hücreleri üzerinde önemli derecede migrasyonu engellediği saptanmıştır. Ayrıca 24. saat sonundaki sonuçlara göre difraktaik asidin evernik asit ile benzer etki gösterdiği, vulpinik asidin ise diğer iki asitten daha etkili bir şekilde migrasyonu engellediği görülmüştür. 48. ve 72. saat sonundaki sonuçlara göre ise üç liken asidinin de migrasyonu yüksek derecede engellediği gözlenmiştir. Bütün saat dilimlerindeki sonuçlara göre en etkili liken asidinin vulpinik asit olduğu saptanmıştır.
4. Evernik asidin HepG2 kanser hücre hattı üzerindeki apoptoz analiz sonuçlarına göre apoptotik etkisinin olmadığı görülmüştür. BAX/BCL2 oranının, P53, TXN ve TRXR1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin değişmediği ve apoptoz analiz sonuçlarını desteklediği gözlenmiştir. Ayrıca TRXR1 proteini üzerine etkileri incelendiğinde kantitatif protein ekspresyon miktarının ve enzim aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Bu durum evernik asidin HepG2 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin, tiyoredoksin redüktaz 1 (TRXR1) ve apoptoz üzerinden gerçekleşmediğini göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda bu etkinin, hücre döngüsünü durdurmak gibi farklı hücresel fonksiyonlar üzerinden gelişebileceğini düşündürebilir.
5. Vulpinik asidin HepG2 kanser hücre hattı üzerinde apoptotik etkisinin olduğu saptanmıştır. Vulpinik asidin BAX/BCL2 oranını artırarak ve TRXR1 enzim inhibisyonu ile apoptozu tetiklemesi sonucunda antikanser etki gösterdiği kanısına varılmıştır. P53 gen ekspresyonunda azalış görülürken TXN gen ekspresyonunda bir değişikliğe rastlanmamıştır. TRXR1'in mRNA ekspresyon sonuçları ise kantitatif protein ekspresyon analizi ile doğru orantılı çıktığı ve artışın olduğu saptanmıştır.
6. Difraktaik asidin HepG2 kanser hücre hattında apoptotik etkisinin olduğu görülmüştür. Difraktaik asidin P53 gen ekspresyon seviyelerini artırarak ve TRXR1 enzim inhibisyonu ile apoptozu indüklemesi sonucunda antikanser etki gösterdiği kanısına varılmıştır. BAX/BCL2 oranında ve TXN gen ekspresyonunda bir değişikliğe rastlanmamıştır. TRXR1'in mRNA ekspresyon sonuçları ise kantitatif protein ekspresyon analizi ile doğru orantılı çıktığı ve artışın olduğu saptanmıştır.
7. Vulpinik ve difraktaik asidin TRXR1'in enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin, tiyoredoksin redüktaz enziminde bulunan selenosistein rezidülerinin bu liken asitleri ile kimyasal bir etkileşime uğramasıyla geliştiğini düşündürebilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, J., & Staffurth, J. J. M. (2016). Hormonal therapy for cancer. **44**(1), 30-33.
- Abreu, I. A., Cabelli, D. E. J. B. e. B. A.-P., & Proteomics. (2010). Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. **1804**(2), 263-274.
- Aksoy, Y., Balk, M., ÖĞÜŞ, H., & Özer, N. J. T. J. o. B. (2005). The mechanism of inhibition of human erythrocyte catalase by azide. **28**(2-4), 65-70.
- Al-Gubory, K. H., Garrel, C., Faure, P., & Sugino, N. J. R. b. o. (2012). Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. **25**(6), 551-560.
- Anonymous. (2021a). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Evernic-acid>
- Anonymous. (2021b). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vulpinic-acid>
- Anonymous. (2021c). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diffractaic-acid>
- Anonymous. (2021d). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lecanoric-acid>
- Anonymous. (2021e). <https://www.nacalai.co.jp/global/reagent/research/annexin.html>
- Anonymous. (2021f). <https://www.reactionbiology.com/services/cell-based-assays/migration-assay-wound-healing-assay-and-oris-assay>
- Aoussar, N., Laasri, F. E., Bourhia, M., Manoljovic, N., Mhand, R. A., Rhallabi, N., Ullah, R., Shahat, A. A., Noman, O. M., Nasr, F. A. J. E.-B. C., & Medicine, A. (2020). Phytochemical Analysis, Cytotoxic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Lichens. **2020**.
- Arner, E. S., & Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Seminars in cancer biology*.
- Arnér, E. S. J. A. i. c. r. (2017). Targeting the selenoprotein thioredoxin reductase 1 for anticancer therapy. **136**, 139-151.
- Arnér, E. S. J. B. e. B. A.-G. S. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases—important selenoproteins with versatile functions. **1790**(6), 495-526.
- Arthur, J. J. C., & CMLS, M. L. S. (2001). The glutathione peroxidases. **57**(13), 1825-1835.
- Arumugam, P., Arunkumar, K., Sivakumar, L., Murugan, M., & Murugan, K. J. T. r. (2019). Anticancer effect of fucoidan on cell proliferation, cell cycle progression, genetic damage and apoptotic cell death in HepG2 cancer cells. **6**, 556-563.
- Asplund, J., & Gauslaa, Y. J. O. (2008). Mollusc grazing limits growth and early development of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in broadleaved deciduous forests. **155**(1), 93-99.
- Atmaca, H., Bozkurt, E., Kısım, A., & Uslu, R. J. T. J. o. B. (2016). Comparative analysis of XTT assay and xCELLigence system by measuring cytotoxicity of resveratrol in human cancer cell lines. **41**(6), 413-421.
- Au, J. S., Frenette, C. T. J. G., & liver. (2015). Management of hepatocellular carcinoma: current status and future directions. **9**(4), 437.
- Bagwell, C. B., & Adams, E. G. J. A. o. t. N. Y. A. o. S. (1993). Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters. **677**(1), 167-184.

- Bali, A., Singh, M. P., Khorate, M., Ahmed, J. J. J. o. C. S., & Therapy. (2010). Malignant fibrous histiocytoma-An unusual transformation from benign to malignant. **2**(2), 53-57.
- Bastem, A. (2017). *Akut İnflamasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Sıçan Karaciğer Dokusunda Moleküler Seviyede Araştırılması* [Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü]. Erzurum.
- BeGora, M. D., & Fahselt, D. J. T. B. (2001). Usnic acid and atranorin concentrations in lichens in relation to bands of UV irradiance. **104**(1), 134-140.
- Berndt, C., Lillig, C. H., & Holmgren, A. J. B. e. b. a.-m. c. r. (2008). Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. **1783**(4), 641-650.
- Biaglow, J. E., Miller, R. A. J. C. b., & therapy. (2005). The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. **4**(1), 13-20.
- Bian, M., Fan, R., Zhao, S., & Liu, W. J. J. o. m. c. (2019). Targeting the Thioredoxin System as a Strategy for Cancer Therapy: Miniperspective. **62**(16), 7309-7321.
- Bjerke, J., Joly, D., Nilsen, L., & Brossard, T. J. P. B. (2004). Spatial trends in usnic acid concentrations of the lichen *Flavocetraria nivalis* along local climatic gradients in the Arctic (Kongsfjorden, Svalbard). **27**(7), 409-417.
- Björnstedt, M., Kumar, S., & Holmgren, A. J. J. o. B. C. (1992). Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. **267**(12), 8030-8034.
- Bobadilla, A. V. P., Arévalo, J., Sarró, E., Byrne, H. M., Maini, P. K., Carraro, T., Balocco, S., Meseguer, A., & Alarcón, T. J. J. o. t. R. S. I. (2019). In vitro cell migration quantification method for scratch assays. **16**(151), 20180709.
- Bogo, D., Matos, M. d. F. C., Honda, N. K., Pontes, E. C., Oguma, P. M., da Silva Santos, E. C., de Carvalho, J. E., & Nomizo, A. J. Z. f. N. C. (2010). In vitro antitumour activity of orsellinates. **65**(1-2), 43-48.
- Bonnin, D. A. A., Havrda, M. C., & Israel, M. A. J. C. r. (2018). Glioma cell secretion: a driver of tumor progression and a potential therapeutic target. **78**(21), 6031-6039.
- Branco, V., Godinho-Santos, A., Gonçalves, J., Lu, J., Holmgren, A., Carvalho, C. J. F. R. B., & Medicine. (2014). Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition, selenium status, and Nrf-2 activation are determinant factors modulating the toxicity of mercury compounds. **73**, 95-105.
- Brandão, L. F. G., Alcantara, G. B., Matos, M. d. F. C., Bogo, D., dos Santos Freitas, D., Oyama, N. M., Honda, N. K. J. C., & Bulletin, P. (2012). Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. c12-00739.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. J. C. a. c. j. f. c. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **68**(6), 394-424.
- Brodo, I. M., Sharnoff, S. D., & Sharnoff, S. (2001). *Lichens of north America*. Yale University Press.
- Bruix, J., Gores, G. J., & Mazzaferro, V. J. G. (2014). Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. **63**(5), 844-855.
- Bruix, J., Sala, M., & Llovet, J. M. J. G. (2004). Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. **127**(5), S179-S188.

- Brunauer, G., Hager, A., Grube, M., Türk, R., Stocker-Wörgötter, E. J. P. P., & Biochemistry. (2007). Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. **45**(2), 146-151.
- Budak, H., Kocpinar, E. F., Gönül, N., Çakır, Ş. N., & Bastem, A. (2016). *Western Blot Tekniği*. Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., & Verotta, L. J. P. M. (2009). bIntroduction. **75**, 607-613.
- Calcott, M. J., Ackerley, D. F., Knight, A., Keyzers, R. A., & Owen, J. G. J. C. S. R. (2018). Secondary metabolism in the lichen symbiosis. **47**(5), 1730-1760.
- Cantara, S., Capezzone, M., Marchisotta, S., Capuano, S., Busonero, G., Toti, P., Di Santo, A., Caruso, G., Carli, A. F., Brilli, L. J. T. J. o. C. E., & Metabolism. (2010). Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. **95**(3), 1365-1369.
- Carlson, B. A., Yoo, M.-H., Tobe, R., Mueller, C., Naranjo-Suarez, S., Hoffmann, V. J., Gladyshev, V. N., & Hatfield, D. L. J. C. (2012). Thioredoxin reductase 1 protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via control of cellular redox homeostasis. **33**(9), 1806-1813.
- Cha, M.-K., Suh, K.-H., Kim, I.-H. J. J. o. E., & Research, C. C. (2009). Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma. **28**(1), 1-12.
- Chabner, B., Lynch, T., & Longo, D. (2013). *Harrisons Manual of Oncology 2/E*. McGraw-Hill Education.
- Chen, H. H., & Kuo, M. T. J. O. (2017). Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. **8**(37), 62742.
- Chen, Y., Cai, J., Murphy, T., & Jones, D. P. J. J. o. B. C. (2002). Overexpressed human mitochondrial thioredoxin confers resistance to oxidant-induced apoptosis in human osteosarcoma cells. **277**(36), 33242-33248.
- Cheng, J.-S., Chou, C.-T., Liu, Y.-Y., Sun, W.-C., Shieh, P., Kuo, D.-H., Kuo, C.-C., Jan, C.-R., Liang, W.-Z. J. F., & Toxicology, C. (2016). The effect of oleuropein from olive leaf (*Olea europaea*) extract on Ca²⁺ homeostasis, cytotoxicity, cell cycle distribution and ROS signaling in HepG2 human hepatoma cells. **91**, 151-166.
- Choi, J. H., Kim, T. N., Kim, S., Baek, S.-H., Kim, J. H., Lee, S.-R., & Kim, J.-R. J. A. r. (2002). Overexpression of mitochondrial thioredoxin reductase and peroxiredoxin III in hepatocellular carcinomas. **22**(6A), 3331-3335.
- Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Gadbaill, A. R., Sharma, A., & Tekade, S. J. O. o. (2014). Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. **50**(1), 10-18.
- Cimmino, A., Nimis, P. L., Masi, M., De Gara, L., van Otterlo, W. A., Kiss, R., Evidente, A., & Lefranc, F. J. P. R. (2019). Have lichenized fungi delivered promising anticancer small molecules? , **18**(1), 1-36.
- Clapp, R. W., Jacobs, M. M., & Loechler, E. L. J. R. o. e. h. (2008). Environmental and occupational causes of cancer new evidence, 2005–2007. **23**(1), 1.
- Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S. G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., Beck, H., Hatzopoulos, A. K., Just, U., Sinowatz, F. J. M., & biology, c. (2004). Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. **24**(21), 9414-9423.

- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. J. N. r. M. c. b. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **8**(10), 813-824.
- D'souza, S., Lau, K. C., Coffin, C. S., & Patel, T. R. J. W. J. o. G. (2020). Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma. **26**(38), 5759.
- Deponte, M. J. B. e. B. A.-G. S. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **1830**(5), 3217-3266.
- Desideri, E., Ciccarone, F., & Ciriolo, M. R. J. N. (2019). Targeting glutathione metabolism: partner in crime in anticancer therapy. **11**(8), 1926.
- Dickinson, D. A., & Forman, H. J. J. B. p. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. **64**(5-6), 1019-1026.
- El-Serag, H. B., Kramer, J. R., Chen, G. J., Duan, Z., Richardson, P. A., & Davila, J. A. J. G. (2011). Effectiveness of AFP and ultrasound tests on hepatocellular carcinoma mortality in HCV-infected patients in the USA. **60**(7), 992-997.
- Elix, J., & Stocker-Wörgötter, E. J. L. b. (2008). Biochemistry and secondary metabolites. 104-133.
- Ellis, G., Bone, H., & Chlebowski, R. J. J. C. O. (2008). ADJUVANT THERAPY. **26**, 4875-4882.
- Fan, H., Tian, W., & Ma, X. J. T. o. (2014). Curcumin induces apoptosis of HepG2 cells via inhibiting fatty acid synthase. **9**(3), 279-286.
- Fernández-Moriano, C., Divakar, P. K., Crespo, A., Gómez-Serranillos, M. P. J. F., & Toxicology, C. (2017). Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. **105**, 262-277.
- Fink, M. P. J. C. O. i. C. N., & Care, M. (2002). Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. **5**(2), 167-174.
- Folkman, J. J. N. m. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **1**(1), 27-30.
- Freeman Jr, R. B., Wiesner, R. H., Harper, A., McDiarmid, S. V., Lake, J., Edwards, E., Merion, R., Wolfe, R., Turcotte, J., & Teperman, L. J. L. T. (2002). The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. **8**(9), 851-858.
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Thayyullathil, F. J. F. R. B., & Medicine. (2017). Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress? , **104**, 144-164.
- Galloway, D. J. J. B. L. (1993). Global environmental change: lichens and chemistry. **53**, 87-95.
- Gan, L., Yang, X. L., Liu, Q., & Xu, H. B. J. J. o. c. b. (2005). Inhibitory effects of thioredoxin reductase antisense RNA on the growth of human hepatocellular carcinoma cells. **96**(3), 653-664.
- García-Caparrós, P., De Filippis, L., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Ozturk, M., Altay, V., & Lao, M. T. J. T. B. R. (2020). Oxidative Stress and Antioxidant Metabolism under Adverse Environmental Conditions: a Review. 1-46.
- Gauslaa, Y., Bidussi, M., Solhaug, K. A., Asplund, J., & Larsson, P. J. P. (2013). Seasonal and spatial variation in carbon based secondary compounds in green algal and cyanobacterial members of the epiphytic lichen genus *Lobaria*. **94**, 91-98.

- Gersch, C., Palii, S. P., Imaram, W., Kim, K. M., Karumanchi, S. A., Angerhofer, A., Johnson, R. J., Henderson, G. N. J. N., Nucleotides, & Acids, N. (2009). Reactions of peroxynitrite with uric acid: formation of reactive intermediates, alkylated products and triuret, and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress. **28**(2), 118-149.
- Gill, S. S., Tuteja, N. J. P. p., & biochemistry. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **48**(12), 909-930.
- Goldman, L., & Ausiello, D. A. (2008). *Cecil medicine* (Vol. 863). Saunders Elsevier Philadelphia.
- Goldstein, S., & Czapski, G. J. C. r. i. t. (2000). Reactivity of Peroxynitrite versus Simultaneous Generation of $\bullet$ NO and $O_2\bullet$ -toward NADH. **13**(8), 736-741.
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. J. N. r. D. d. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **12**(12), 931-947.
- Grandér, D. J. M. o. (1998). How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? , **15**(1), 20-26.
- Gromer, S., Urig, S., & Becker, K. J. M. r. r. (2004). The thioredoxin system—from science to clinic. **24**(1), 40-89.
- Halama, P., & Van Haluwin, C. J. B. (2004). Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. **49**(1), 95-107.
- Halliwell, B., & Chirico, S. J. T. A. j. o. c. n. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **57**(5), 715S-725S.
- Harris, I. S., & DeNicola, G. M. J. T. i. c. b. (2020). The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer.
- Hauck, M., & Huneck, S. J. J. o. c. e. (2007). Lichen substances affect metal adsorption in Hypogymnia physodes. **33**(1), 219-223.
- Hauck, M. J. E. P. (2008). Metal homeostasis in Hypogymnia physodes is controlled by lichen substances. **153**(2), 304-308.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. J. G. r. (1996). Real time quantitative PCR. **6**(10), 986-994.
- Hill, K. E., McCollum, G. W., & Burk, R. F. J. A. b. (1997). Determination of thioredoxin reductase activity in rat liver supernatant. **253**(1), 123-125.
- Hirota, K., Matsui, M., Murata, M., Takashima, Y., Cheng, F. S., Itoh, T., Fukuda, K., Junji, Y. J. B., & communications, b. r. (2000). Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF- κ B, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. **274**(1), 177-182.
- Holzerova, E., Danhauser, K., Haack, T. B., Kremer, L. S., Melcher, M., Ingold, I., Kobayashi, S., Terrile, C., Wolf, P., & Schaper, J. J. B. (2016). Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration. **139**(2), 346-354.
- Honegger, R. (2009). Lichen-forming fungi and their photobionts. In *Plant relationships* (pp. 307-333). Springer.
- Honegger, R. J. A. r. o. p. b. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. **42**(1), 553-578.

- Hong, J.-M., Suh, S.-S., Kim, T. K., Kim, J. E., Han, S. J., Youn, U. J., Yim, J. H., & Kim, I.-C. J. M. (2018). Anti-cancer activity of lobaric acid and lobarstin extracted from the antarctic lichen *Stereocaulon alpnum*. **23**(3), 658.
- Hsu, I., Metcalf, R., Sun, T., Welsh, J., Wang, N., & Harris, C. J. N. (1991). Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. **350**(6317), 427-428.
- Huang, Q., Zhou, H. J., Zhang, H., Huang, Y., Hinojosa-Kirschenbaum, F., Fan, P., Yao, L., Belardinelli, L., Tellides, G., & Giordano, F. J. J. C. (2015). Thioredoxin-2 inhibits mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis stress kinase-1 activity to maintain cardiac function. **131**(12), 1082-1097.
- Hukkamlı, B. (2018). *Akut İnflamasyon Durumunda Fare Karaciğer Ve Böbrek Dokusunda Tiyoredoksin Sistemin Gen Ve Protein Seviyesinde Çalışılması*. [Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü]. Erzurum.
- Hulkower, K. I., & Herber, R. L. J. P. (2011). Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **3**(1), 107-124.
- Ishii, H., Okada, S., Nose, H., Okusaka, T., Yoshimori, M., Takayama, T., Kosuge, T., Yamasaki, S., Sakamoto, M., & Hirohashi, S. J. C. I. I. J. o. t. A. C. S. (1996). Local recurrence of hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection. **77**(9), 1792-1796.
- Jakupoglu, C., Przemeck, G. K., Schneider, M., Moreno, S. G., Mayr, N., Hatzopoulos, A. K., de Angelis, M. H., Wurst, W., Bornkamm, G. W., Brielmeier, M. J. M., & biology, c. (2005). Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. **25**(5), 1980-1988.
- Janssen, A., Bosman, C., Kruidenier, L., Griffioen, G., Lamers, C., Van Krieken, J., Van de Velde, C., Verspaget, H. J. J. o. c. r., & oncology, c. (1999). Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence. **125**(6), 327-335.
- Jia, J.-J., Geng, W.-S., Wang, Z.-Q., Chen, L., Zeng, X.-S. J. C. c., & pharmacology. (2019). The role of thioredoxin system in cancer: strategy for cancer therapy. 1-18.
- Johansson, C., Lillig, C. H., & Holmgren, A. J. J. o. B. C. (2004). Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. **279**(9), 7537-7543.
- Jourd'heuil, D., Jourd'heuil, F. L., Kutchukian, P. S., Musah, R. A., Wink, D. A., & Grisham, M. B. J. J. o. B. C. (2001). Reaction of Superoxide and Nitric Oxide with Peroxynitrite: IMPLICATIONS FOR PEROXYNITRITE-MEDIATED OXIDATION REACTIONS IN VIVO. **276**(31), 28799-28805.
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. J. I. j. o. m. s. (2012). Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. **13**(3), 3145-3175.
- Jönsson-Videsäter, K., Björkhem-Bergman, L., Hossain, A., Söderberg, A., Eriksson, L. C., Paul, C., Rosén, A., & Björnstedt, M. J. B. p. (2004). Selenite-induced apoptosis in doxorubicin-resistant cells and effects on the thioredoxin system. **67**(3), 513-522.
- Karlenius, T. C., & Tonissen, K. F. J. C. (2010). Thioredoxin and cancer: a role for thioredoxin in all states of tumor oxygenation. **2**(2), 209-232.
- Khodabandehloo, H., Zahednasab, H., & Hafez, A. A. J. I. j. o. c. p. (2016). Nanocarriers usage for drug delivery in cancer therapy. **9**(2).
- Kiebal, M., Skalska, J., Casulo, C., Brookes, P. S., Peterson, D. R., Hilchey, S. P., Dai, Y., Grant, S., Maggirwar, S. B., & Bernstein, S. H. J. E. h. (2015). Dual targeting of the

- thioredoxin and glutathione antioxidant systems in malignant B cells: a novel synergistic therapeutic approach. **43**(2), 89-99.
- Kılıç, N., Aras, S., & Cansaran-Duman, D. J. A.-C. A. i. M. C. (2018). Determination of vulpinic acid effect on apoptosis and mRNA expression levels in breast cancer cell lines. **18**(14), 2032-2041.
- Kılıç, N., Derici, K., Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., & Cansaran-Duman, D. J. I. J. P. E. R. (2018). Evaluation of in vitro anticancer activity of vulpinic acid and its apoptotic potential using gene expression and protein analysis. **52**(3), 46-54.
- Kim, H., Chae, H.-Z., Kim, Y.-J., Kim, Y. H., Hwang, T.-S., Park, E.-M., Park, Y.-M. J. C. b., & toxicology. (2003). Preferential elevation of Prx I and Trx expression in lung cancer cells following hypoxia and in human lung cancer tissues. **19**(5), 285-298.
- Kim, H., Kim, K. K., & Hur, J.-S. (2015). Anticancer activity of lichen metabolites and their mechanisms at the molecular level. In *Recent advances in lichenology* (pp. 201-208). Springer.
- Kim, S., So, H. M., Roh, H.-S., Kim, J., Yu, J. S., Lee, S., Seok, S., Pang, C., Baek, K.-H., & Kim, K. H. J. R. a. (2017). Vulpinic acid contributes to the cytotoxicity of *Pulveroboletus ravenelii* to human cancer cells by inducing apoptosis. **7**(56), 35297-35304.
- Kirtonia, A., Sethi, G., Garg, M. J. C., & Sciences, M. L. (2020). The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. 1-25.
- Kızıl, H. E. (2016). *Bazı liken sekonder metabolitlerinin antiproliferatif, apoptotik ve antioksidatif özelliklerinin belirlenmesi*. [Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı]. Erzurum.
- Kızıl, H. E., & Açar, G. (2017). Antiproliferative and apoptotic effects of diffractaic acid in A549 and AGS cancer cells. AIP Conference Proceedings.
- Koharyova, M., Kolarova, M. J. G. p., & biophysics. (2008). Oxidative stress and thioredoxin system. **27**(2), 71-84.
- Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T., Ranković, B. J. F., & toxicology, c. (2013). *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. **53**, 112-118.
- Kumar, S., Bjoernstedt, M., & Holmgren, A. J. E. j. o. b. (1992). Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non- stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. **207**(2), 435-439.
- Laurent, T. C., Moore, E. C., & Reichard, P. J. J. o. B. C. (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides: IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia Coli* B. **239**(10), 3436-3444.
- Lawrey, J. D. (1995). Lichen allelopathy: a review.
- Le Pogam, P., Herbette, G., & Boustie, J. (2015). Analysis of lichen metabolites, a variety of approaches. In *Recent Advances in Lichenology* (pp. 229-261). Springer.
- Lencioni, R. J. H. (2010). Loco- regional treatment of hepatocellular carcinoma. **52**(2), 762-773.
- Levine, A. J., & Puzio-Kuter, A. M. J. S. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. **330**(6009), 1340-1344.
- Levine, R. L. J. F. R. B., & Medicine. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **32**(9), 790-796.

- Liang, D., Zhu, T., Ni, Z., Lin, L., Tang, Y., Wang, Z., Wang, X., Wang, J., Lv, X., & Xia, H. J. P. O. (2017). Ascorbic acid metabolism during sweet cherry (*Prunus avium*) fruit development. **12**(2), e0172818.
- Liang, M.-H., Zhu, J., Jiang, J.-G. J. C. r. i. f. s., & nutrition. (2018). Carotenoids biosynthesis and cleavage related genes from bacteria to plants. **58**(14), 2314-2333.
- Llovet, J. M., Fuster, J., & Bruix, J. J. L. t. (2004). The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. **10**(S2), S115-S120.
- Loeb, L. A. J. C. r. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. **51**(12), 3075-3079.
- Luo, H.-L., Chen, J., Luo, T., Wu, F.-X., Liu, J.-J., Wang, H.-F., Chen, M., Li, L.-Q., Li, H. J. C. P., & Biochemistry. (2017). Downregulation of macrophage-derived T-UCR uc. 306 associates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **42**(4), 1526-1539.
- Luo, H., Yamamoto, Y., Kim, J. A., Jung, J. S., Koh, Y. J., & Hur, J.-S. J. P. B. (2009). Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). **32**(7), 1033-1040.
- Macias, F. A., Molinillo, J. M., Varela, R. M., & Galindo, J. C. J. P. M. S. F. P. S. (2007). Allelopathy—a natural alternative for weed control. **63**(4), 327-348.
- Magain, N., Goffinet, B., & Sérusiaux, E. J. T. B. (2012). Further photomorphs in the lichen family Lobariaceae from Reunion (Mascarene archipelago) with notes on the phylogeny of *Dendroscocaulon* cyanomorphs. 243-254.
- Mahmood, D. F. D., Abderrazak, A., El Hadri, K., Simmet, T., Rouis, M. J. A., & signaling, r. (2013). The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. **19**(11), 1266-1303.
- Marante, F. T., Castellano, A. G., Rosas, F. E., Aguiar, J. Q., & Barrera, J. B. J. J. o. C. E. (2003). Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. **29**(9), 2049-2071.
- Matsui, A., Ikeda, T., Enomoto, K., Hosoda, K., Nakashima, H., Omae, K., Watanabe, M., Hibi, T., & Kitajima, M. J. C. l. (2000). Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. **151**(1), 87-95.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., & Taketo, M. M. J. D. b. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. **178**(1), 179-185.
- May, S., Parry, C., & Parry, L. J. F. F. (2020). Berry chemoprevention: Do berries decrease the window of opportunity for tumorigenesis. **1**(3), 260-275.
- Mazza, F. J. Z. M. (1925). Constitution and physical properties of vulpinic acid. **31**, 182-190.
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A., & Gennari, L. J. N. E. J. o. M. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. **334**(11), 693-700.
- Minn, A. H., Hafele, C., & Shalev, A. J. E. (2005). Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces β -cell apoptosis. **146**(5), 2397-2405.

- Miranda- Vizuite, A., Damdimopoulos, A. E., Pedrajas, J. R., Gustafsson, J. Å., & Spyrou, G. J. E. j. o. b. (1999). Human mitochondrial thioredoxin reductase: cDNA cloning, expression and genomic organization. **261**(2), 405-412.
- Miranda, A., Janssen, L., Bosman, C. B., van Duijn, W., Oostendorp-van de Ruit, M. M., Kubben, F. J., Griffioen, G., Lamers, C. B., Han, J., & Van Krieken, J. J. C. C. R. (2000). Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. **6**(8), 3183-3192.
- Molnár, K., & Farkas, E. J. Z. f. N. C. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. **65**(3-4), 157-173.
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*.
- Mondal, S., Bandyopadhyay, S., K Ghosh, M., Mukhopadhyay, S., Roy, S., & Mandal, C. J. A.-C. A. i. M. C. (2012). Natural products: promising resources for cancer drug discovery. **12**(1), 49-75.
- Mukherjee, S. (2010). *The emperor of all maladies: a biography of cancer*. Simon and Schuster.
- Muller, P. A., & Vousden, K. H. J. C. c. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. **25**(3), 304-317.
- Muri, J., Heer, S., Matsushita, M., Pohlmeier, L., Tortola, L., Fuhrer, T., Conrad, M., Zamboni, N., Kisielow, J., & Kopf, M. J. N. c. (2018). The thioredoxin-1 system is essential for fueling DNA synthesis during T-cell metabolic reprogramming and proliferation. **9**(1), 1-16.
- Nash, T. H. (1996). *Lichen biology*. Cambridge University Press.
- Nguyen, K.-H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., & Tomasi, S. J. N. p. r. (2013). UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. **30**(12), 1490-1508.
- Nimis, P., Skert, N. J. E., & Botany, E. (2006). Lichen chemistry and selective grazing by the coleopteran *Lasioderma serricorne*. **55**(1-2), 175-182.
- Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., & Takayasu, S. J. J. o. B. C. (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. **286**(6), 4760-4771.
- Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., Powis, G. J. M., & biology, c. (2003). The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. **23**(3), 916-922.
- Ouyang, Y., Peng, Y., Li, J., Holmgren, A., & Lu, J. J. M. (2018). Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems. **10**(2), 218-228.
- Ozgencli, I., Budak, H., Ciftci, M., & Anar, M. J. A.-C. A. i. M. C. (2018). Lichen acids may be used as a potential drug for cancer therapy; by inhibiting mitochondrial thioredoxin reductase purified from rat lung. **18**(11), 1599-1605.
- Ozgencli, I., Kilic, D., Guller, U., Ciftci, M., Kufrevioglu, O. I., & Budak, H. J. A.-C. A. i. M. C. (2018). A comparison of the inhibitory effects of anti-cancer drugs on thioredoxin reductase and glutathione S-transferase in rat liver. **18**(14), 2053-2061.
- Ozyigit, I. I., Filiz, E., Vatansever, R., Kurtoglu, K. Y., Koc, I., Öztürk, M. X., & Anjum, N. A. J. F. i. p. s. (2016). Identification and comparative analysis of H₂O₂-scavenging

- enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. **7**, 301.
- ÖZYİĞİTOĞLU, G. Ç., AÇIKGÖZ, B., & SESAL, C. J. A. B. T. (2017). Lichen secondary metabolites: Synthesis pathways and biological activities. **29**(4), 150-163.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. J. P. r. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **87**(1), 315-424.
- Paiva, C. N., Bozza, M. T. J. A., & signaling, r. (2014). Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? , **20**(6), 1000-1037.
- Paluszczak, J., Kleszcz, R., Studzińska-Sroka, E., Krajka-Kuźniak, V. J. M., & biochemistry, c. (2018). Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. **441**(1), 109-124.
- Patlevič, P., Vašková, J., Švorc Jr, P., Vaško, L., & Švorc, P. J. I. m. r. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. **5**(4), 250-258.
- Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, J. S., Hong, S. G., Shin, H. W., & Yim, J. H. J. P. r. (2008). Antibacterial potential of Antarctic lichens against human pathogenic Gram- positive bacteria. **22**(9), 1269-1271.
- Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S.-A., Haywood, P., Brown, C., & Ward, R. J. P. o. (2017). Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. **12**(10), e0184360.
- Poljšak, B., Dahmane, R. J. D. r., & practice. (2012). Free radicals and extrinsic skin aging. **2012**.
- Pöykkö, H., & Hyvärinen, M. J. J. o. A. E. (2003). Host preference and performance of lichenivorous *Eilema* spp. larvae in relation to lichen secondary metabolites. 383-390.
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. J. C. l. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **387**, 95-105.
- Raffel, J., Bhattacharyya, A. K., Gallegos, A., Cui, H., Einspahr, J. G., Alberts, D. S., Powis, G. J. J. o. L., & Medicine, C. (2003). Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. **142**(1), 46-51.
- Ramalingam, V., & Rajaram, R. J. P. B. (2020). A paradoxical role of reactive oxygen species in cancer signaling pathway: Physiology and pathology.
- Rao, D., & LeBlanc, F. J. B. (1965). A possible role of atranorin in the lichen thallus. 284-289.
- Reichl, P., & Mikulits, W. J. O. r. (2016). Accuracy of novel diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma: An update for clinicians. **36**(2), 613-625.
- Rescigno, M., Avogadri, F., & Curigliano, G. J. B. e. B. A.-R. o. C. (2007). Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. **1776**(1), 108-123.
- Rhee, S. G., Woo, H. A., Kil, I. S., & Bae, S. H. J. J. o. B. C. (2012). Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. **287**(7), 4403-4410.
- Rolfs, F., Huber, M., Gruber, F., Böhm, F., Pfister, H. J., Bochkov, V. N., Tschachler, E., Dummer, R., Hohl, D., & Schäfer, M. J. C. r. (2013). Dual role of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 6 in skin carcinogenesis. **73**(11), 3460-3469.
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*. Oxford University Press.
- S Hernandez, M., & RG Britto, L. J. C. n. (2012). NADPH oxidase and neurodegeneration. **10**(4), 321-327.

- Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. J. N. R. C. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? , **14**(11), 709-721.
- Sanders, W. B., & DE LOS RÃOS, A. J. T. L. (2016). Structure of foliicolous thalli of the Gomphillaceae in a south-western Florida lichen community. **48**(4), 293.
- Schmeda- Hirschmann, G., Tapia, A., Lima, B., Pertino, M., Sortino, M., Zacchino, S., Arias, A. R. d., Feresin, G. E. J. P. R. A. I. J. D. t. P., & Derivatives, T. E. o. N. P. (2008). A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protousnea poeppigii*. **22**(3), 349-355.
- Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., Fernie, A. R., & Hinch, D. K. J. S. r. (2016). Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **6**(1), 1-10.
- Seminario, A., Song, L., Zulet, A., Nguyen, H. T., González, E. M., & Larrainzar, E. J. F. i. p. s. (2017). Drought stress causes a reduction in the biosynthesis of ascorbic acid in soybean plants. **8**, 1042.
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. J. C. R. i. O. (2013). On the origin of cancer metastasis. **18**(1-2).
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y. C. J. A., & Signaling, R. (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. **6**(2), 289-300.
- Sheth, S., Bodnar, J., Ghazalpour, A., Thippavong, C., Tsutsumi, S., Tward, A., Demant, P., Kodama, T., Aburatani, H., & Lusis, A. J. O. (2006). Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice. **25**(25), 3528-3536.
- Shi, Y., Ren, Y., Zhao, L., Du, C., Wang, Y., Zhang, Y., Li, Y., Zhao, S., & Duan, H. J. F. l. (2011). Knockdown of thioredoxin interacting protein attenuates high glucose-induced apoptosis and activation of ASK1 in mouse mesangial cells. **585**(12), 1789-1795.
- Shrestha, G., & Clair, L. L. S. J. P. r. (2013). Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. **12**(1), 229-244.
- Shrestha, G., El- Naggar, A. M., St. Clair, L. L., & O'Neill, K. L. J. P. R. (2015). Anticancer activities of selected species of North American lichen extracts. **29**(1), 100-107.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. J. C. a. c. j. f. c. (2019). Cancer statistics, 2019. **69**(1), 7-34.
- Sies, H. J. A. C. I. E. i. E. (1986). Biochemistry of oxidative stress. **25**(12), 1058-1071.
- Sies, H. J. R. b. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **11**, 613-619.
- Sigurbjörnsdóttir, M. A., Andrsson, . S., Vilhelmsson, O. J. W. J. o. M., & Biotechnology. (2016). Nutrient scavenging activity and antagonistic factors of non-photobiont lichen-associated bacteria: a review. **32**(4), 68.
- Silva, G. . F., Nunes, R. A. L., Morale, M. G., Boccardo, E., Aguayo, F., & Termini, L. J. C. (2018). Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. **73**.
- Solhaug, K. A., & Gauslaa, Y. J. O. (1996). Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. **108**(3), 412-418.
- Sonmez, F. (2018). *Demir Yüklemesi Durumunda Tiyoredoksin Sistemin Fare Karaciğer Ve Böbrek Dokusunda Gen Ve Protein Seviyesinde alışılması* [Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü]. Erzurum.

- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. J. A. r. r. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. **12**(1), 376-390.
- Sönmez Aydın, F., Hukkamlı, B., Budak, H. J. J. o. B., & Toxicology, M. (2021). Coaction of hepatic thioredoxin and glutathione systems in iron overload- induced oxidative stress. **35**(4), e22704.
- Stockwell, B. R., Angeli, J. P. F., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S. K., & Kagan, V. E. J. C. (2017). Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. **171**(2), 273-285.
- Sudhakar, A. J. J. o. c. s., & therapy. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. **1**(2), 1.
- Sumbayev, V. V. J. A. o. b., & biophysics. (2003). S-nitrosylation of thioredoxin mediates activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. **415**(1), 133-136.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. J. C. a. c. j. f. c. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **71**(3), 209-249.
- Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi- Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda, S., Wada, H., & Spyrou, G. J. T. E. j. (2002). Thioredoxin- 2 (TRX- 2) is an essential gene regulating mitochondria- dependent apoptosis. **21**(7), 1695-1703.
- Tonini, T., Rossi, F., & Claudio, P. P. J. O. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. **22**(42), 6549-6556.
- Tonissen, K. F., Di Trapani, G. J. M. n., & research, f. (2009). Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. **53**(1), 87-103.
- Townsend, D. M., Tew, K. D., Tapiero, H. J. B., & Pharmacotherapy. (2003). The importance of glutathione in human disease. **57**(3-4), 145-155.
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. J. N. r. D. d. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? , **8**(7), 579-591.
- Truong, T. L., Nga, V. T., Huy, D. T., Chi, H. B., & Phung, N. K. J. N. p. c. (2014). A new depside from *Usnea aciculifera* growing in Vietnam. **9**(8), 1934578X1400900831.
- Van Cutsem, E., & Arends, J. J. E. j. o. o. n. (2005). The causes and consequences of cancer-associated malnutrition. **9**, S51-S63.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. J. s. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **324**(5930), 1029-1033.
- Vanita, P., Subrahmanyam, V., & Jhansi, K. J. J. C. M. (2011). A short note on cancer. **2**, 128.
- Varol, M., Türk, A., Candan, M., Tay, T., & Koparal, A. T. J. P. r. (2016). Photoprotective activity of vulpinic and gyrophoric acids toward ultraviolet B- induced damage in human keratinocytes. **30**(1), 9-15.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. J. J. o. i. m. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **184**(1), 39-51.
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D. J. C. S., & Chaperones. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. **17**(1), 11-21.
- Vijayakumar, C., Viswanathan, S., Reddy, M. K., Parvathavarthini, S., Kundu, A. B., & Sukumar, E. J. F. (2000). Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **71**(5), 564-566.

- Weidinger, A., & Kozlov, A. V. J. B. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. **5**(2), 472-484.
- White, P. A., Oliveira, R., Oliveira, A. P., Serafini, M. R., Araújo, A. A., Gelain, D. P., Moreira, J. C., Almeida, J. R., Quintans, J. S., & Quintans-Junior, L. J. J. M. (2014). Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: a systematic review. **19**(9), 14496-14527.
- Wilson, T. R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., & Sosman, J. J. N. (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. **487**(7408), 505-509.
- Winterbourn, C. C. J. T. I. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **82**, 969-974.
- Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., & Poole, L. B. J. T. i. b. s. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **28**(1), 32-40.
- Wösten, H. A., & Wessels, J. G. J. M. (1997). Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. **38**(3), 363-374.
- Wrede, D., Taha, M., Miranda, A. F., Kadali, K., Stevenson, T., Ball, A. S., & Mouradov, A. J. P. o. (2014). Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **9**(11), e113497.
- Yamamoto, Y. J. P. M. (1995). Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. **61**, 113115.
- Yoo, M.-H., Xu, X.-M., Carlson, B. A., Gladyshev, V. N., & Hatfield, D. L. J. J. o. B. C. (2006). Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. **281**(19), 13005-13008.
- Yoshida, T., Oka, S.-I., Masutani, H., Nakamura, H., Yodoi, J. J. A., & Signaling, R. (2003). The role of thioredoxin in the aging process: involvement of oxidative stress. **5**(5), 563-570.
- Zhang, B., Zhang, J., Peng, S., Liu, R., Li, X., Hou, Y., Han, X., & Fang, J. J. E. o. o. t. p. (2017). Thioredoxin reductase inhibitors: a patent review. **27**(5), 547-556.
- Zhang, K., Che, S., Pan, C., Su, Z., Zheng, S., Yang, S., Zhang, H., Li, W., Wang, W., Liu, J. J. J. o. c., & medicine, m. (2018). The SHH/Gli axis regulates CD 90- mediated liver cancer stem cell function by activating the IL 6/JAK 2 pathway. **22**(7), 3679-3690.
- Zhang, Q., Chen, W., Lv, X., Weng, Q., Chen, M., Cui, R., Liang, G., & Ji, J. J. F. i. p. (2019). Piperlongumine, a novel TrxR1 inhibitor, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by ROS-mediated ER stress. **10**, 1180.
- Zheng, H., Ke, X., Li, D., Wang, Q., Wang, J., Liu, X., Deng, M., Deng, X., Xue, Y., & Zhu, Y. J. C. C. (2018). NEDD4 promotes cell growth and motility in hepatocellular carcinoma. **17**(6), 728-738.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. J. P. r. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **94**(3), 909-950.
- Žugić, A., Tadić, V., Kundaković, T., & Savić, S. J. L. s. (2018). Chemical composition and biological activities of the extracts and secondary metabolites of lichens belonging to the genus *Usnea*, Parmeliaceae. (38), 68-80.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Emine KARACA
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Erzurum Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı (2021)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi