

T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MDA-MB-231 ÜZERİNE *CLADONIA*
FURCATA'NIN KORUYUCU ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

ELİF AKBULUT

Tez Danışmanı
Doç. Dr. MUSTAFA KOCAKAYA

YOZGAT - 2023

T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MDA-MB-231 ÜZERİNE *CLADONIA*
***FURCATA*'NIN KORUYUCU ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

ELİF AKBULUT

Tez Danışmanı
Doç. Dr. MUSTAFA KOCAKAYA

Bu çalışma Yozgat Bozok Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-2022-1042 kodu ile desteklenmiştir.

YOZGAT – 2023

TEZ BEYANI

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

ELİF AKBULUT

16.02.2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MDA-MB-231 ÜZERİNE *Cladonia furcata*'nın KORUYUCU ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ELİF AKBULUT

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. MUSTAFA KOCAKAYA

Likenler, mantar ve alglerden oluşan yaygın ve dayanıklı bir türdür. *Cladonia* cinsine ait *Cladonia furcata*, toprak ve çimler üzerinde, genellikle nispeten açık alanlarda yayılış gösterir. Canlı organizmalarda temel olarak ihtiyaç duyulan çeşitli mikro elementler bu liken türünde yüksek miktarlarda bulunur. Yapılan araştırmalar neticesinde *C. furcata*, sağlıklı olması ve yaşam kalitesini desteklediği için besleyici gıda olarak günlük alımda tercih edilmektedir. Birçok liken türünün yüksek oranlarda ihtiva ettiği bileşenler antibakteriyel, antimitotik ve antiviral özellikler sergilediği bildirilmiştir. Bundan dolayı memeli hücre kültürleri olan MDA-MB-231 üzerindeki *C. furcata* dozlarının koruyucu etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu çalışmada, meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerine artan dozlarda *C. furcata* uygulanarak etkileri, MTT yöntemi (3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid), komet, antioksidan ve apoptoz yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. *C. furcata*'nın MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki koruyucu etkisi kontrol grubu ve uygulama grupları (10-200 µg/ml) oluşturularak LD₅₀ değeri 60 µg/ml olarak bulunmuştur. Yapılan sitotoksikite analizi sonuçlarına göre, *C. furcata* konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerdeki apoptoz ve nekroz tespiti için kontrol grubu, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml, 120 µg/ml, 200 µg/ml *C. furcata* uygulanan gruplar floresan mikroskopta bakılarak apoptoz ve nekroza uğrayan hücrelerin fotoğrafları çekilmiş ve kanserli hücreler üzerine öldürücü etki gösterdiği belirlenmiştir. Genetoksik hasar için komet yöntemi kullanılmıştır. Likenlerin antioksidan etkisi kullanılan ELISA kitler kapsamında SOD, CAT, GPx antioksidan süpürücü etkisi, MDA miktarına bağlı lipid toksisitesi belirlenmiş olup doza bağlı olarak meydana gelen değişimler ortaya konulmuştur. Bu çalışmaların ışığında *C. furcata*'nın insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde *in vitro* koşullarda koruyucu etki gösterdiği dozlar, çalışılan parametreler kapsamında tespit edilmiştir. Mevcut çalışma literatüre katkı sağlayacak ve bundan sonraki kapsamlı çalışmalara da ışık tutacaktır.

2023, 59 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Meme Kanseri, *Cladonia furcata*, Apoptoz Testi, MTT Testi, komet testi, antioksidan testi.

ABSTRACT

MASTER THESIS

PROTECTIVE EFFECTS OF *Cladonia furcata* ON MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINE

ELİF AKBULUT

YOZGAT BOZOK UNIVERSITY
SCHOOL OF GRADUATES STUDIES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Assoc. Prof. Dr. MUSTAFA KOCAKAYA

Lichens are a common and hardy species consisting of fungi and algae. *Cladonia furcata*, belonging to the *Cladonia* genus, on soil and grass, usually in relatively open areas shows the spread. Various microelements, which are essential for living organisms, are found in high amounts in this lichen species. As a result of research conducted in China, *C. furcata* is preferred for daily intake as a nutritious food because it is healthy and supports quality of life. It has been reported that usnic acid, one of the components that many lichen species contain at high rates, exhibits antibacterial, antimitotic and antiviral properties. Therefore, it was aimed to investigate the protective effects of *C. furcata* doses on mammalian cell cultures, MDA-MB-231. In this study, the effects of *C. furcata* applied to breast cancer cell line MDA-MB-231 cells at increasing doses were evaluated using the MTT method (3-(4,5-dimethyl triazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) and apoptosis method. The protective effect of *C. furcata* on MDA-MB-231 cells was found to be 60 µg/ml by forming the control group and administration groups (10-200 µg/ml). According to the results of cytotoxicity analysis, it was determined that cell viability decreased due to the increase in *C. furcata* concentration. For the detection of apoptosis and necrosis in cells, the control group, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml, 120 µg/ml, 200 µg/ml *C. furcata* applied groups were viewed under a fluorescent microscope and the photos of the cells that underwent apoptosis and necrosis were taken. It has been determined that it has a lethal effect on cells. The comet method was used for genetic damage and statistical measurements. SOD, CAT, GPx antioxidant scavenging effect and lipid toxicity due to MDA amount were measured within the scope of ELISA kits using the antioxidant effect of lichens. In the light of these studies, the doses at which *C. furcata* exerted a protective effect on the human breast cancer cell line MDA-MB-231 *in vitro* were determined within the scope of the studied parameters. The present study will contribute to the literature and will shed light on future comprehensive studies.

2023, 59 PAGE

KEYWORDS: Breast Cancer, *Cladonia furcata*, Apoptosis Test, MTT Test, comet test, antioxidant test.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç.Dr. Mustafa KOCAKAYA'ya, tez çalışmasının yürütülmesinde destek olan Sayın Prof. Dr. Dilek PANDIR'a, laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimini paylaşarak desteğini esirgemeyen doktora öğrencisi Derya GÜL'e ve tüm hocalarıma, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgili anneciğim Halime AKBULUT'a, sevgili babacığım İdris AKBULUT'a ve kardeşlerim Muhammet AKBULUT, Nihal AKALAN ve Kadirhan AKBULUT'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca çok sevdiğim arkadaşlarım İrem Büşra BODUROĞLU, Furkan ÇALIŞ, Kadri GÜRSEL ve Hüsamettin EKİM'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması;

Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje Kodu: FYL-2022-1042).

ELİF AKBULUT

16.02.2023

İÇİNDEKİLER

Tez Onay Sayfası	ii
Tez Beyanı	iii
Özet	iv
Abstract	v
Önsöz	vi
İçindekiler	vii
Şekiller Listesi	x
Tablolar Listesi	xi
Simgeler ve Kısaltmalar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	3
2.2. Kanser Türleri	4
2.3. Meme Kanseri	5
2.3.1. Meme Kanserinde Epidemiyoloji	5
2.3.2. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	6
2.3.2.1. MDA-MB-231	6
2.4. Likenler	7
2.4.1. <i>Cladonia furcata</i>	8
2.5. Komet Testi	9
2.5.1. Komet Yönteminin Genel Basamakları	10
2.6. Malondialdehit (MDA)	11
2.7. Antioksidan Savunma Sistemi	11
2.7.1. Hücre İçi Antioksidan Koruma Sistemleri	12
2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	12
2.7.1.2. Katalaz (CAT)	13
2.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	13
2.7.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malonaldehit (MDA)	13
2.7.2.1. Lipid Peroksitlerin Toksisitesi	14
2.8. Hücre Ölüm Mekanizmaları	14
2.8.1. Apoptoz	14
2.8.2. Nekroz	15
2.8.3. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Kullanılan Kimyasallar	17
3.2. Kullanılan Cihazlar	17
3.3. Kullanılan gereçler	18
3.4. Yöntemler	18
3.4.1. Liken Örneklerinin Hazırlanışı	19
3.4.1.1. Likenin Ekstrakte Edilmesi	19
3.4.2. Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi	19
3.4.2.1. Hücre Kültürü Besiyeri Hazırlanması	19
3.4.2.2. MDA-MB-231 Hücre Hattının Kültüre Aktarılması	20
3.4.2.3. MDA-MB-231 Hücre Hattının Pasajlanması	20
3.4.2.4. MDA-MB-231 Hücre Hattının Muhafaza Edilmesi	20

3.4.2.5. Hücre Sayımı	21
3.4.2.6.MTT Yöntemi	21
3.4.2.6.1. MTT Yöntemi ile MDA-MB-231 Hücreleri Üzerinde LD ₅₀ Belirlenmesi	21
3.4.3. DNA Hasarının Tespit Edilmesi	22
3.4.3.1. Komet Testi Yöntemi	22
3.4.4. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi	23
3.4.5. SOD, CAT ve GPx Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	24
3.4.6. Akridin Oranj/Etidyum Bromid (AO/EB) Çift Boyama	24
4. BULGULAR	26
4.1. MTT Testi Sonuçları	26
4.2. Komet Testi Analiz Sonuçları	27
4.3. MDA Seviyesinin Değerlendirilmesi	29
4.4. SOD Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	30
4.5. CAT Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	31
4.6. GPx Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	32
4.7. Akridin Oranj- Etidyum Bromür Boyası ile Apoptoz Saptanması	33
5. SONUÇ ve ONERILER	34
6. KAYNAKLAR	39
7. ÖZGEÇMİŞ	50

TABLÖLAR LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında DNA hasarının ($\pm$ SD) % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin ortalama değerleri.	28

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	MDA-MB-231 hücreleri mikroskop görüntüsü	7
Şekil 2.2.	<i>Cladonia furcata</i> 'ın görüntüsü	9
Şekil 4.1.	<i>Cladonia furcata</i> 'nın hücre canlılığı üzerine etkileri	26
Şekil 4.2.	Floresan mikroskopta çekilmiş DNA hasarı görüntüleri	28
Şekil 4.3.	Kontrol ve uygulama gruplarının MDA seviyeleri	29
Şekil 4.4.	Kontrol ve uygulama gruplarının SOD enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	30
Şekil 4.5.	Kontrol ve uygulama gruplarının CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	31
Şekil 4.6.	Kontrol ve uygulama gruplarının GPx enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	32
Şekil 4.7.	Apoptotik hücrelerin floresan mikroskobunda görüntüsü.	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklamalar
cm²	: Santimetrekare
CO₂	: Karbondioksit
dak	: Dakika
dH₂O	: Distile Su
gr	: Gram
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
L	: Litre
LD₅₀	: %50 Öldürücü Doz
ml	: Mililitre
m²	: Metrekare
nm	: Nanometre
O₂	: Oksijen
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
°C	: Derece Santigrat

Kısaltmalar	Açıklamalar
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CAT	: Katalaz
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu
DMSO	: DimetilSülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
HER2	: Büyüme Faktörü Reseptörü
EDTA	: EtilendiaminTetraasetik Asit
ER	: Östrojen Reseptörü
EtBr	: Etidiyum Bromür
FBS	: FetalBovine Serum
GPx	: GlutatyonPeroksidaz
GSH	: Glutatyon

LMA	: Düşük Erime Noktalı Agaro
LPO	: Lipit Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MDA-MB-231	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MKC	: Meme Koruyucu Cerrahi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NMA	: Yüksek Erime Noktalı Agaro
PBS	: Fosfat Tamponu
PR	: Progesteron Reseptörü
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: SüperoksitDismutaz

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü kanseri, vücudun bitişik kısımlarını işgal edebilen ve/veya diğer organlara yayılabilen anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile tanımlanan oldukça geniş bir yelpazesi olan bir hastalık grubu şeklinde tanımlamaktadır. DSÖ'nün 2020 yılına ait tahmin verilerine göre Türkiye'deki meme kanserinin insidansı yüz bin nüfusta diğer kanser türlerine göre en sık görülen kanser türüdür. (Bray vd., 2018); (Piñeros vd., 2022); (T.C. Sağlık Bakanlığı. (2020)).

Antikanser ilaç geliştirmedeki mevcut ilerlemeye, geleneksel spesifik olmayan sitotoksik ajanlardan spesifik hedef bazlı terapilere ve bağışıklıkla ilgili modülatörlere geçişe rağmen doğadan yeni antikanser ilaçlarının keşfi, modern kanser araştırmaları için önemli olmaya devam etmekte, birçok potansiyel doğal ürün kaynağı büyük ölçüde keşfedilmemiş olarak kalmaktadır (Liu vd., 2017).

Likenler, sırasıyla fotobiyontlar ve mikobiyontlar olarak hareket eden fotoototrofik algler veya siyanobakteriler ve mantarlar arasındaki simbiyotik ilişkilerdir. Algler ve mantarlar iki farklı organizma türüdür ve doğaları da oldukça farklıdır. Morfolojik ve fizyolojik olarak farklı olan likenler organizma olarak hareket etmek için doğalarını kaybederler (Goga vd., 2017).

Eski zamanlardan beri likenler tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Kimyasal ve farmakolojik araştırmalar ikincil liken ürünlerinin biyolojik aktivite gösterdiğini ve antibiyotik, UV absorbansı ve antioksidan olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Yamamoto vd., 1993).

Bu tez çalışmasının amacı, bir liken türü olan *Cladonia furcata*'nın insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde *in vitro* koşullarda koruyucu etki sağladığı çalışılan parametreler kapsamında tespit edilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

Meme kanseri, kadınlarda teşhis edilen sıklıkla karşılaşılan bir kanser türüdür ve her yıl 10 yeni kanser teşhisinde meme kanseri türleri birden fazla oran vermektedir. Bu oran meme kanserini dünyada kadınlar arasındaki kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın sebebi olarak tanımlamaktadır. Meme kanseri her zaman sessizce gelişir. Hastaların çoğu hastalıklarını rutin taramaları sırasında keşfederler. Meme kanseri teşhis edilirken fiziki muayene, mamografi ve doku biyopsisi ile tanı yapılmaktadır. Erken tanı ile hayatta kalma oranı artmaktadır (Piñeros vd., 2022).

Genel olarak, gelişmiş ülkelerdeki yüksek meme kanseri oranları, hastalık için bilinen risk faktörlerinin daha yüksek prevalansının bir sonucudur; bunların çoğu memenin menarştan menopozda yumurtlamanın kesilmesine kadar maruz kaldığı hormonal (büyük ölçüde östrojen) ortamla ilgilidir (Pike vd., 1983). Gelişmekte olan birçok ülkede görülen kadınların daha yüksek paritesi ve daha erken ilk gebelik yaşı, gelişmiş ülkelere kıyasla bu bölgelerde meme kanseri insidansının çok daha düşük aralıklarda olduğunu göstermektedir (Lane, 1926).

Nüfus istatistikleri, birçok gelişmiş ülkede yaşa göre ayarlanmış meme kanseri ölüm oranlarının 1990'ların başında düşmeye başladığını göstermektedir. Birçok araştırmacı, mortalitedeki düşüşü mamografi taramasına bağlamaktadır (Gotzsche ve Olsen, 2000).

2.1. Kanser

Organizma/organ/doku gelişimi, hücrelerde büyüme, çoğalma ve hücre ölümleri de dâhil olup hasarlı dokularda meydana gelen onarım fonksiyonu somatik hücrelerin ve destek dokunun hasarlı bölgeye birikmesiyle ortaya çıkmaktadır (Lodish vd., 2000).

Hücre gelişimi, değişimi ve çoğalması esnasında meydana gelen mutasyonlarda proto-onkogenler rol almaktadır. Bu şekilde ortaya çıkan yapılar tümör gelişimine neden

olur. Tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkan mutasyonlar ise hücrelerin anormal bir şekilde büyümesine neden olmaktadır (Vermeulen, Bockstaele ve Berneman, 2003).

Tüm kanserlerin ortaya çıkma sebebi çoğunlukla DNA dizisindeki anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Yaşam boyunca, hücrelerimizdeki DNA, mutajenlere maruz kalır ve replikasyon hataları kaçınılmaz olmaktadır. Bu hatalar da her hücrenin DNA dizisinde ilerleyici, ince değişiklikler gösterir. DNA üzerinde meydana gelen somatik mutasyonlar, kritik bir genin işlevini değiştirerek, olduğu hücreye büyüme avantajı sağlamaktadır. Bu hücreden türetilen genişletilmiş bir klonun ortaya çıkmasıyla ilgili hedef genlerdeki ek mutasyonlar, klonal genişleme dalgaları sonucunda çevre dokuları istila eden ve metastaz yapan hücreleri üretmektedir (Futreal vd., 2001).

Hücre DNA'sında ve genlerde meydana gelen değişiklikler hücrelerde kontrolsüz bölünmeyi başlatarak tümör olarak adlandırılan yapıları meydana getirmektedir. Tümörler çevre dokulara ve tüm vücuda yayılabilmektedir. Hücrelerin anormal olarak kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliğini göstermesi kanser olarak tanımlanmaktadır. Kanserinin malign etkilerinden biri olan metastaz özelliği kazanması sadece bölgesel yayılma ile ortaya çıkmadığını diğer dokuları da istila edebildiğini göstermektedir (Ringer ve Schniper, 2000).

"Epigenetik" kelimesi 1940'ların başında geleneksel genetik olarak tam olarak açıklanamayan olayları tanımlamak için adlandırılmıştır (Waddington, 1968). Epigenetik alan artık bu fenomenlerin altında yatan moleküler mekanizmaları aktif olarak ortaya çıkarmaktadır ve epigenetik mitotik ve/veya mayotik olarak kalıtsal olan ve DNA dizisinde bir değişiklik gerektirmeyen gen fonksiyonundaki değişikliklerin incelenmesi" olarak tanımlanmıştır (Wu ve Morris, 2001).

Tümör baskılayıcılardaki ve/veya onkogenlerdeki mutasyonlar, sırasıyla bir fonksiyon kaybına veya kazanımına neden olur ve bu genlerin anormal ekspresyonunun kanser başlangıcı ile bağlantılı olması muhtemeldir. Yapılan araştırmalara göre epigenetik değişikliklerin genetik değişiklikleri indükleyebileceği ve tümörün ilerlemesine ve ayrıca

başlamasına etkide bulunabileceğine dair bir hipotez önerilmiştir (Feinberg, Ohlsson ve Henikoff, 2006).

Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda, hücre siklusunu baskılayan bir protein tarafından genomik kararlılık sağlanır, hücre siklusu G1 'de inhibe edilir ve hücreye tamir için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptozise gider (Vermeulen, Bockstaele ve Berneman, 2003). DNA tamir genlerinde bir mutasyon oluştuğunda hücreler bir yandan bölünmeye devam ettiği için tümör baskılayıcı fonksiyonlarında kayıp olurken diğer yandan hücreler onkogenik fonksiyon sergilemektedir (Kearns ve Liu, 2001); (Flatt ve Pietenpol, 2000); (Cheng vd., 1998).

2.2. Kanser Türleri

1. Lösemiler
 - a. Akut Lenfoblastik Lösemi
 - b. Akut Myeloblastik Lösemi
 - c. Kronik Lenfositik Lösemi
 - d. Kronik Myelositik Lösemi
2. Baş ve Boyun Kanseri
3. Akciğer Kanseri
4. Özefagus ve Mide Kanseri
5. Kolorektal Kanseri
6. Pankreas Kanseri
7. Karaciğer Kanseri
8. Safra Kesesi Kanseri
9. Endokrin Bezlerin Kanseri
10. Üriner Sistem Kanseri
 - a. Mesane Kanseri
 - b. Böbrek Kanseri
11. Meme Kanseri
12. Jinekolojik Kanseri

13. Erkek Genital Organ Kanseri
14. Merkezi Sinir Sistemi Kanseri
15. Cilt Kanseri
16. Kemik Kanseri
17. Lenfomalar
 - a. HodgkinLenfoma
 - b. NonHodgkinLenfoma
18. MultipleMyeloma

2.3. Meme Kanseri

2.3.1. Meme Kanserinde Epidemiyoloji

Meme kanseri dünya genelinde kanser tanısı alan bir kanser türü olup ortalama dört kadından birinin meme kanseri olduğu tanımlanmakta ve 100'den fazla ülkede kadınlarda kanser ölümlerinde birinci sıradadır (Arbyn vd., 2020).

Meme kanseri insidansı diğer risk faktörleri yanı sıra en çok yaşla ilişkisi bulunmaktadır. Meme kanseri görülmesi aktif üreme yaşlarının sonuna doğru 40-50 yaşlarda hızlı artış ve 50 yaş civarı menopoz sonrası hafif bir düşüş göstermektedir (Key, Verkasalo ve Banks, 2001).

Kadınlarda görülen kanser türleri arasında meme kanserinin en sık görülen kanserler içerisinde görülme oranı %10,3 (24.175) ve mortalite oranı ise %5,7 (7.161)'dir (Sung vd., 2021).

2.3.2. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanserinde ilk “Moleküler Sınıflama” 2000 yılında Perou ve Sorlie tarafından gerçekleştirildi ve meme kanserleri gen ekspresyon farklılıklarına göre farklı alt gruplara ayrıldığı açıklanmıştır. Kanser türlerinin alt gruplara ayrımı ER, ER düzenleyici genler, “HER-2 pozitif” (ERBB2/HER-2 amplifikasyonu ve overekspresyonu gösteren), HER-2 negatif olan ve memenin normal bazal/myoepitelial hücreleri tarafından eksprese

edilen gen ekspresyonu gösteren, lüminal epitelial hücrelerden eksprese edilen genlerin ekspresyonunu yansıtan olarak, “bazal” ER ve PR şeklinde ayrılmaktadır (Perou vd., 2000).

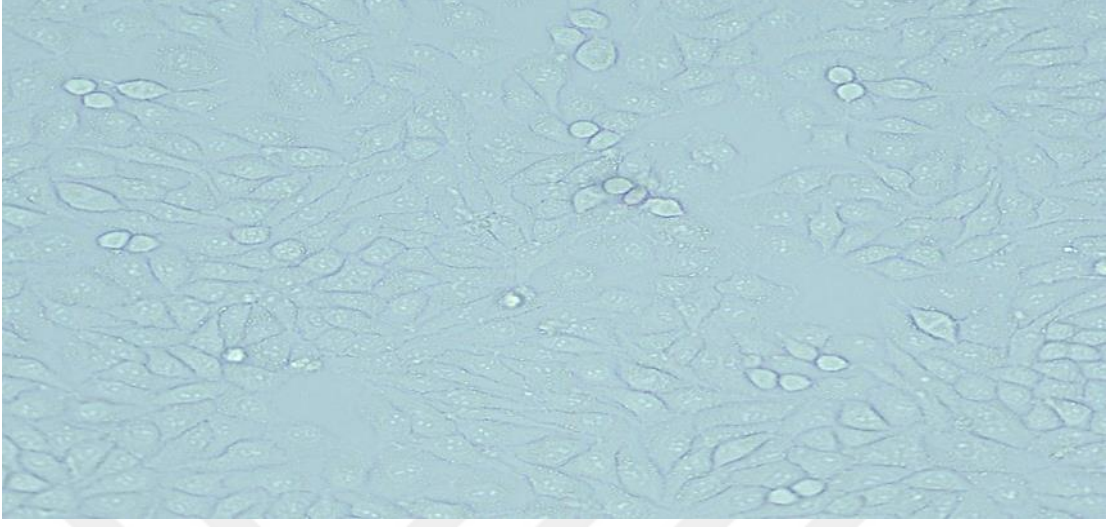
Meme kanseriyle ilgili çalışmalarda birçok hücre hattı kullanılmaktadır ve bu hücre hatlarının özellikleri birbirinden farklıdır. Örneğin; T47D ve MCF-7 hücre hatları ER-pozitif (ER+) hücre hatları iken, MDA-MB-468, MDA-MB-453, MDA-MB-231 ve SKBR3 hücre hatları ER-negatif (ER-) hücre hatlarıdır (Li vd., 2019).

2.3.2.1. MDA-MB-231

MDA-MB-231 hücre hattı, insan meme kanseri hücre hattıdır. Araştırma laboratuvarlarında en sık kullanılan meme kanseri hücre hatlarından biridir.

MDA-MB serisi hücre hatları M.D. Anderson Enstitüsü’nde geliştirilmiş hücrelerdir. M.D. Anderson-Metastatic Breast kısaltması olan MDA-MB kullanılarak adlandırılmıştır (Dohr, Vogel ve Abel, 1995). MDA-MB-231 yüksek derecede metastatik bir hücre hattıdır (Burdall vd., 2003). MDA-MB-231 hücrelerinin karakteristik özellikleri şunlardır; metastatik adenokarsinom, plevral efüzyon, ER-, PR-, HER2- yani üçlü negatif, agresif ve invaziv karakter, kemoterapi duyarlılığı orta derecedir (Holliday ve Speirs, 2011); (Neve vd., 2006).

Bu hücre hattı yapışma özelliği sergileyen bir yapı gösterir, bu sebeple *in-vitro* kültür çalışmalarında kolaylıkla kullanılabilir (Liu, Kummerow ve Elsaesser, 2017); (Lokerse vd., 2017).



Şekil 2.1. MDA-MB-231 hücreleri mikroskop görüntüsü.

2.4. Likenler

Likenler; alg ve mantarların bir araya gelerek meydana getirdikleri morfolojik ve fizyolojik birliklerdir. Diğer bir deyişle likenler; alg ile mantarların kurdukları simbiyoz (ortak yaşayış) bir yaşam şeklidir. Fungus bileşeni (mikobiyont), yeşil algler veya mavi yeşil algler (fotobiyont) ile simbiyotik işbirliği kurmayı başaran bir Ascomycetes veya Basidiomycetes üyesidir. Bu ayrı bileşenler bir araya geldiklerinde liken oluşturmeyen fungus ve algler ile hiçbir benzerlik göstermeyen uzun ömürlü bir tallus meydana getirirler. Yapıya katılan fungus ve algler sadece tallustan kesit alındığında ve mikroskop altında incelendiğinde tanımlanması yapılabilmektedir (Lawrey, 1986).

Likenlerin savunmacı doğası, çok çeşitli kanserlere karşı mükemmel bir anti-kanser potansiyeline sahip oldukları için farmasötik açıdan çok önemli bir noktadır (Zambare ve Christopher, 2012).

Likenlerin antioksidan aktiviteye sahip olmaları, onların besin şeklinde alınmaları halinde ömür uzunluğunu ve antimutajenik aktiviteyi artırabileceğini düşündürmüştür (Altun, 2007).

Antimutajenik ve antikarsinojenik özelliğe sahip kimyasal bileşikleri araştırmak ve keşfetmek insanlarda artan kanser riski ve mutasyon oranlarındaki artışın beraberinde getirdiği istenmeyen sonuçlar nedeniyle günümüzde zorunlu hale gelmiştir. Kanser de dahil koruyucu metabolit ürünlerin hastalıklar üzerindeki inhibe edici etkisi *in vivo* ve *in vitro* olarak deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen sonuçlar ile koruyucu özellikli bitkiler üzerine olan çalışmaların artmasına katkıda bulunmuştur (Abdullaev vd., 2003).

2.4.1. *Cladonia furcata* (Hudson) Schrad

Podesyum 2-5(-8) uzunluğa kadar, mavimsi yeşilden koyu gri-yeşile kadar, silindirik, dikotomik dallanmış, az çok uçları belirgin şekilde incelmış ve kadehsizdir; üst yüzey tamamen korteksli, düz çoğunlukla mermer görünümünde, bazen seyrek pullar ve çatlaklar içerir. Bazal pullar belirsiz, yuvarlak, 3 mm çapına kadar; alt yüzey beyaz renktedir. Apotesyum kahverengi, kısa ve yan dalların uçlarına doğrudur. Tallus P(+) kırmızı, K(-) ya da K(+) sarı, KC(-), C(-).

C. furcata, göze çarpmayan bir birincil thallusa sahip bir podetia liken formudur. Bu liken yüzeyi çok pürüzsüz ve bazen oldukça skuamülozdur. *C. furcata*'nın habitatı genellikle açık topraktır, ancak diğer habitatlar arasında gölgeli çayırlar, ova fundalıkları, yol kenarları veya kaya çıkıntıları ve ormanlar bulunur (Ahti ve Sipman, 2013); (Purvis vd., 1992).

Bu liken Türkiye'de Çanakkale, Edirne, Kırklareli bölgelerinde bulunmaktadır. Literatürde bu türün asidik habitatlarda bulunmadığı belirtilmesine rağmen Türkiye'de asidik habitatlardan da örnek toplanmıştır (Kocakaya ve Kocakaya, 2022).



Şekil 2.2. *Cladonia furcata* tallusu (Kocakaya ve Kocakaya, 2022).

2.5. Komet Testi

Alkalın kuyruklu yıldız testi veya tek hücreli jel elektroforezi, insan nüfusu üzerinde DNA hasarının değerlendirilmesi için en popüler yöntemlerden biridir (Collins, 2004); (Azqueta vd., 2020).

Test, hızlı, basit ve hassas olup, kuyruklu yıldız testini mesleki veya çevresel mutajenlere maruz kalmanın etkisini incelemek, çeşitli hastalıklarla ilgili olarak DNA hasarı seviyelerini incelemek, yaşam tarzı, diyet ve diyet takviyesinin insan hücrelerinin taze veya donmuş örneklerinde genetik stabilite üzerindeki etkisini ölçmek ve kontrol etmek için çok uygun kılan niteliklerdir (Collins vd., 2014).

DNA hasarının varlığı veya yetersiz onarımı, kanser ve diğer bulaşıcı olmayan hastalıkların etiyolojisinde iyi bilinen bir faktördür ve bu nedenle kuyruklu yıldız analizi gelecekteki hastalık riskini gösteren erken genetik hasarları tespit etmektedir (Milic vd., 2015).

Komet testinin diğer genotoksisite testlerine göre avantajları, düşük DNA hasarı seviyelerini tespit etmedeki duyarlılığı, numune başına az sayıda hücre gereksinimi ve esnekliği, basitliği, uygulama kolaylığı, ekonomisi ve kısa süresidir (Collins, 2004).

Bu avantajlardan dolayı, kuyruklu yıldız analizi, moleküler epidemiyoloji çalışmalarında sıklıkla DNA hasarı biyobelirteç olarak kullanılır ve pestisitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ağır metaller veya iyonlaştırıcı radyasyon gibi mesleki ve çevresel tehlikeli ajanların etkilerinin izlenmesinde önemli bir rol oynar (Collins vd., 2014); (Üstündağ vd., 2022).

2.5.1. Komet Yönteminin Genel Basamakları

1- Hücrelerin izolasyonu

2- Slaytların hazırlanması

3- Hücre lizizi

4- Tek hücreli elektroforez

5-Nötralizasyon

6-Boyama ve değerlendirme şeklinde 6 aşamada incelenmektedir (Collins vd., 2014).

2.6. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), enzimatik yapıda olmayan oksidatif lipid peroksidlerinin metabolize olmasıyla meydana gelen hücrenin yapısı, şekli ve işlevi bakımından fonksiyonlarını hasara uğratan aldehit yapılı bir bileşiktir. İki'den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda serbestleşen siklik endoperoksidler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmaktadır. Hücrede biriken MDA'nın ölçümü, lipid peroksid seviyelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca aldehit yapılı bileşiklerin bozunmaya

karşı dayanıklı olması ve hücre zarına rahatlıkla girebilmesi, lipid peroksidasyonunun etkilerinin bu bileşiklerden kaynaklandığını ortaya koymaktadır (Özdemir vd., 2004).

2.7. Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidanlar, insan vücudunda serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif stresi ortadan kaldıran, serbest radikalleri etkisiz hale getirebilen ve hücre hasarını önleyebilen maddelerdir. Oluşan oksidatif stres engellenmediğinde ise DNA, karbonhidrat, lipid ve proteinlerde yapısal bozulmalara yol açmaktadır. İnsanlarda bulunan antioksidanları ya vücut kendisi üretir ya da dışarıdan hazır olarak alır. Hem eksojen hem de endojen antioksidanlar serbest radikalleri süpürücü olarak hareket ederler. Bu nedenle de savunma sisteminin etkisini arttırıp hastalık riskini azaltmış olurlar (Sen vd., 2010); (Shinde, Ganu ve Naik, 2012); (Tosun ve Karadeniz, 2005).

Hücrede lipid, protein ve DNA gibi okside olabilecek maddeleri koruyan antioksidan mekanizmalar serbest radikallerin oksidasyonunu inhibe edebilir veya geciktirebilmektedir. Bu mekanizmada rol oynayan maddelere antioksidan denir. Antioksidanlar serbestçe dolaşan radikalleri yakalayarak hücrede meydana gelebilecek hasarları önlemektedirler. Antioksidanların dört farklı mekanizması vardır (Sies ve Cadenas, 1985).

Temizleme etkisi; serbest oksijen radikallerini etkileyerek onların tutulması ya da oksidanları daha zayıf bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirmedir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder (Halliwell, 2007).

Baskılama etkisi; Oksidanlara bir hidrojen aktararak onları etkisiz hale getirme ya da etkilerinin veya reaksiyon hızlarının azaltılması. Vitaminler ve flavonoidler ise etkilerini bu yolla gösterirler (López ve Denicola, 2013).

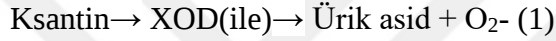
Onarma etkisi; serbest radikallerin lipiti protein ve DNA gibi yapılarda oluşturdukları biyolojik hasarın onarılmasıdır (Pisoschi ve Pop, 2015).

Zincir koparma etkisi; serbest oksijen radikallerini bağlayarak, zincirlerini kırıp işlevlerinin engellenmesidir (Valko vd., 2007).

2.7.1. Hücre İçi Antioksidan Koruma Sistemleri

2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD), oksijene ve hidrojen peroksite dismutasyonu sonucu meydana gelen toksik süperoksit radikallerini arttırır. SOD miktarının belirlenmesi işleminde ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) enzimlerinden faydalanılır. Ortamda serbest dolaşan radikaller nitro blue tetrazolium (N.B.T) ile etkileşir ve aşağıda verildiği gibi SOD, süperoksit radikallerini etkisiz hale getirir, 2 numaralı formazan reaksiyonunu. SOD fonksiyonu hücre içinde gerçekleşmediğinde bu toksik radikaller hidroksil radikallerinin (OH) oluşumuna yol açar. (Takahashi vd., 2004).



2.7.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT) , yeryüzünde oldukça fazla miktarlarda özellikle de bitkilerde bolca bulunan bir enzimdir. Katalaz enzimi hücrede var olan, SOD'un katalizi sonucu ortamda biriken H_2O_2 'i indirgeyerek parçalamaktadır. Peroksizomların ise yapısal bir bileşeni olan oksidaz enzimlerinden biridir (Higashi, Kawamata ve Sakamoto, 1974); (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Bitkisel kaynaklarda bulunan katalaz enzimi içeren alt birimlerden oluşur (Eising, Trelease ve Ni, 1990).

Katalaz enzimi; reaktif oksijen türlerinden olan ve hücrel zarara neden olduğu bilinen ve toksik etkisi olan hidrojen peroksitin suya dönüştürülmesini tek yönlü olarak katalizler. CAT enzimi, substrat olarak kullandığı hidrojen peroksitten, hem elektron alıcısı hemde elektron vericisi olarak faydalanmaktadır (Lanir ve Schejter, 1975); (Jones ve Masters, 1976); (Robertson, 2004).

2.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, protein yapıda alt birimlerden oluşur. Bu alt birimlerin tamamında bir selenyum atomu bulunmaktadır. GPx, hücrelerin sitoplazmasında bulunarak H_2O_2 'den kaynaklanan oksidatif hasara karşı hücreleri korumaktadır. Hücre içinde miktarı artan H_2O_2 radikali inhibe edilir ve hidroksil (OH) oluşumunun önüne geçilmiş olunur. Elektron kaynağı olarak GPx, glutasyonu (GSH) kullanır. H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri (DNA hidroperoksitler ve lipid hidroperoksitler) metabolize eden enzimdir (Sen vd., 2010).

2.7.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malaonaldehit (MDA)

Serbest radikaller hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu meydana getirir. Lipid peroksidasyonu yağ asidi zincirlerinden hidrojen atomlarının koparılması sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali özelliği kazanması ile başlar. Lipid radikalleri moleküler oksijen ile reaksiyon verir ve lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipit peroksit radikalleri membran yapısındaki diğer yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikalleri oluşumuna neden olmaktadır. Bu reaksiyonda açığa çıkan hidrojeni lipid peroksit bağlayarak lipidperoksitlerine dönüşürler. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Lipid peroksitler yıkıldığında açığa çıkan yıkım ürünleri (acrolein, malondialdehit, 4-hidroksinonenal) biyolojik olarak aktiftir. Bunlar ya hücrede metabolize edilir ya da hücrenin diğer bölümlerine hasarı yaymaktadır (Young ve Woodside, 2001); (Ayala, Muñoz ve Argüelles, 2014).

Malondialdehit (MDA), yağ asidi peroksidasyonu mekanizmasının temelde en çok çalışılan ürünüdür. Tespit edilen MDA miktarı yağ asidi oksidasyonunun doğrudan göstergesi olmamakla birlikte hücrede meydana gelen lipid peroksidasyonunu ortaya koyarak toksik etkisi bakımından göstergedir. 1960'lardan bu yana, *in vivo* ve *in vitro* olarak oksidatif stres seviyesini ölçmek için bu molekül değerlendirilmiş ve farklı olarak da birkaç yöntem geliştirilmiştir (Frankel ve Neff, 1983).

2.7.2.1. Lipid Peroksitlerin Toksisitesi

Serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemlerdeki en önemli etkileri lipidler üzerine olanıdır. Bu olay lipid peroksidasyon olarak bilinir ve kısaca hücrelerdeki zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olayı şeklinde tanımlanmaktadır (Arıcıoğlu vd., 1994); (Comporti, 1993); (Draper, 1990).

2.8.Hücre Ölüm Mekanizmaları

2.8.1.Apoptoz

Apoptozis; Bir canlının zorunlu olarak hayatını devam ettirebilmesi için işlevini yerine getiremeyen, kullanılmayan hücrelerin uzaklaştırılmasını ortamın homeostazını bozmadan sağlayan programlı hücre ölümü şeklinde tanımlanmaktadır (Öktem, Ülger ve Kırktok, 2001); (Columbano, 1995).

Apoptozla hücre ölümü esnasında ATP kullanılır. Hücrede kanama yangı gibi etkiler olmadan programlı oldukça gelişmiş bir şekilde meydana gelmektedir (Guimaraes ve Linden 2004); (Nguyen, 2001).

Programlı hücre ölümü canlı hücreler de oldukça ehemmiyetlidir. DNA hasar aldığında apoptoz mekanizması devreye girer. Böylece bu mekanizma ile olası mutasyon ve kanser oluşumunun önüne geçilmektedir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

2.8.2.Nekroz

Beklenmedik bir şekilde rasgele ortaya çıkan bir durumdur. Bu yüzden nekroz ile meydana gelen ölümlerde genler rol almamaktadır. Nekrozun meydana gelmesindeki birincil ve en sık rastlanılan sebep hipoksidir. Toksik maddeler özellikle ağır metaller nekroza neden olur. Nekroz meydana geldiğinde mitokondriyal ROS miktarı yükselir, nonapoptotik proteazlar etkinleşir, enerji salınımı düşer ve Ca^{++} kanalları açılır (Golstein ve Kroemer, 2007); (Nicotera ve Melino, 2004).

2.8.3.Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar

Nekrozis mekanik bir ölüm fonksiyonu sergilerken apoptozis hem mekanik hem de hücresel şartlar altında meydana gelebilir. Apoptozis sadece hücresel bozukluklar olduğunda görülmez aynı zamanda sağlıklı olduğumuzda da görülmektedir (Brouckaert vd., 2004). Nekroziste hücre su alarak şişer apoptotik hücre ise kompakt bir hal alarak sıkışır (Willingham, 1999). Nekroza uğrayan hücrelerin membranı bozularak yapısını kaybeder membran parçaları hücre dışına atılır. Apoptotik hücre membranın şekli bozulmaz ve üzerinde küçük kesecikler meydana gelir.

Nekrotik hücre hemen lizise olmaz ama apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır, değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekroziste plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptoziste apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Horobin ve Kiernan, 2020).

Bu çalışmada, meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerine artan dozlarda *Cladonia furcata* uygulanarak kanserden koruyucu etkileri apoptoz, MTT yöntemi (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) ve komet yöntemi kullanılarak araştırılmış, malondialdehit (MDA) seviyesi ve antioksidan enzim aktiviteleri de incelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

DMEM-F12 Medium (MULTICELL)

Fetalbovine serum (FBS)

Penicilin-Streptomycin (GIBCO)

PBS (BIOMATIC)

Trypsin-EDTA %25 (STEMCELL)

MTT kiti (Roche)

Dimetilsülfoksit (GIBCO)

Agaroz

Ethidium Bromide

3.2. Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik Kabini Class 2 (Bilser)

İnverted Mikroskop (ZEISS)

Floresan mikroskop (BAB)

CO₂ İnkübatör(Memmert)

Otoklav (Nüve OT 23S)

Santrifüj (Nüve NF 800R)

Mini santrifüj (Eppendorf)

Pipet Aid (Macroman)

Hassas Terazı (Radwag AS 220)

Otomatik Pipetler (Nichipet)

pH metre (MettlerToledo)

VortexMixer (Dragon Lab)

Su Banyosu (Memmert WNB22)

ELISA Cihazı (BMG LABTECH)

Elektroforez cihazı (CleaverScientific)

Manyetik Karıştırıcı (Daihan)

3.3. Kullanılan gereçler

Steril Filtre (BD FALCON)

Santrifüj Tüp 50 mL (NEST)

Santrifüj Tüp 15 mL (NEST)

Tek Kullanımlık Serolojik Pipet (5-10 mL) (CAPP)

T75 (75 cm²'lik kültür flask)

T25 (25 cm²'lik kültür flask)

Plate (96 kuyucuklu)(CITOTEST)

Plate (6 kuyucuklu)

Mikropipet ucu (10, 100, 1000µl)

Şırınga filtreleri (0.22 µm)

Tek Kullanımlık Enjektör

3.4. Yöntemler

Bu çalışmada, hücreler ile yapılan tüm çalışmalarda sterilizasyona büyük bir özen gösterilmiş, çalışmalar sırasında kullanılan hücrelerin strese maruz kalmamaları için, hücrelerle temas edecek olan her türlü çözelti/çözücünün 37°C’de ve santrifüj işlemleri de 5 dakika süreyle, 1000 rpm de gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, *Cladonia furcata*’nın meme kanseri üzerinde koruyucu etkileri analiz edilirken, meme kanseri hücre hattı olarak kullanılan MDA-MB-231 hücreleri tercih edilmiştir. MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif) meme kanseri hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilmiştir.

3.4.1. Liken Örneklerinin Hazırlanışı

Cladonia furcata, 26.04.2022 tarihinde Hatay, Arsuz şehrinden toplanmıştır. Örnekler, Boğazlıyan Meslek Yüksekokulu Liken Laboratuvarında muhafaza edilmektedir. İncelenen likenlerin tespiti standart yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.1.1. Likenin Ekstrakte Edilmesi

Liken örneğinden 10 g tartılır ve havanda toz haline gelinceye kadar öğütülür. Toz haline gelen likenler % 70’lik metanol kullanılarak Kocakaya ve arkadaşlarının yöntemine göre ekstre edildi (Z.Kocakaya, M.Kocakaya ve Şeker, 2021). Özler süzülür ve daha sonra bir döner buharlaştırıcıda azaltılmış basınç altında konsantre edilir. Kuru ekstraktlar, testlerde kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilir. Ekstraktlar deneyler için steril ortamda %70’lik alkolde çözüldü ve seyreltmeler besi yeri kullanarak gerçekleştirilir. Plaka yüzeyinde temiz bir görüntü elde etmek ve partiküllerden temizlemek amacıyla hazırlanan liken dozları 0,22’lik filtre ile süzülür.

3.4.2. Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi

3.4.2.1. Hücre Kültürü Besiyeri Hazırlanması

Besiyeri, kültüre edilen MDA-MB-231 hücre hattının dondurulması, çözündürülmesi, pasajlanması amacıyla birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Besiyeri hazırlanırken 3

temel farklı çözelti kullanılmaktadır. Fetal buzağı serumu (FBS; Fetal Bovine Serum), penisilin/streptomisin antibiyotiği ve DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılarak hazırlandı. Steril kabin içerisinde hazırlanan besiyeri filtreden geçirilip otoklavlı bir şişede +4°C'de tutuldu. Çalışmaların hemen öncesinde 37°C'deki su banyosunda inkübe edilerek kullanıldı.

3.4.2.2. MDA-MB-231 Hücre Hattının Kültüre Aktarılması

Kryo tüplerde dondurulmuş olan MDA-MB-231 hücreleri çalışılmak üzere -80°C'den alınıp su banyosunda çözülmesi sağlandı. Hücreler çözüldükten sonra hızlı bir şekilde santrifüj tüpüne alınıp üzerine DMSO'nun etkisini azaltmak için 5 ml taze besiyeri yavaş bir şekilde eklenerek pipet edildi ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilip hücre pelleti üzerine besiyeri eklendi ve flasklara ekimi yapıldı. Hücrelerin çoğalması için %5 CO₂ içeren ve 37°C'de ki inkübatöre kaldırıldı. Hücreler %70-80 oranında konfluent oluncaya kadar besiyeri iki günde bir değiştirildi.

3.4.2.3. MDA-MB-231 Hücre Hattının Pasajlanması

Hücrelerin konfluent olduğu flasktan tripsin ile kaldırılıp, başka bir flaska hücrelere zarar vermeden transfer edilmesi işlemine pasajlama denir. Hücreler %70-80 oranında konfluent olduğunda ortalama iki günlük aralıklarla pasajlama yapıldı. Pasajlama esnasında flask yüzeyinde yapışık olan hücrelere zarar vermeden flaskın yüzeyine yapışmamış halde bulunan ölü hücreler 25 cm²'lik flask için yaklaşık 3ml fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile hücreleri kaldırmadan yıkandı ardından PBS çekilip atıldı. Hücrelerin flask dibinden kaldırılması için 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilip hücrelere etki etmesi için inkübatöre kaldırıldı. Flask yüzeyinden kalkan hücreler uzantılı yapışmış haldeki görünümünden yuvarlak görünüme sahip olur. Tripsinin hücreleri etkilememesi için besiyeri eklenmesinin ardından falkona alınıp 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Pellet besiyeri ile süspanse edildi ve iki ayrı flaska bölünerek pasajlandı. Hücreler in dağılımı ve görünümü inverted mikroskop ile kontrol edildi. Kullanılan flaskların üzerine tarih ve pasaj sayısı yazılarak inkübatöre kaldırıldı.

3.4.2.4. MDA-MB-231 Hücre Hattının Muhafaza Edilmesi

Flaskın %80-90 konfluent olmasının ardından besiyeri çekilip atıldı ve 25 cm²'lik flask için yaklaşık 2 ml PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 25 cm²'lik flask için 1 ml Tripsin-EDTA ile muamele edilip yüzeyden kaldırılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve oluşan hücre pellet üzerine %5 Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren FBS eklenerek etiketlenmiş olan kryo tüpler içerisine alındı. Seri bir şekilde dondurulması ve ilerleyen zamandaki çalışmalarda kullanılması için -80°C'de saklandı.

3.4.2.5. Hücre Sayımı

Hücreler, negatif yüklü bir boya olan tripan blue ile thoma lamalarında saymak için boyanmıştır. Sağlıklı olan hücreler boyayı absorbe etmediği için beyaz renkte görünür. Cansız hücreler ise boyayı hücre içerisine alarak mavi renkli görünürler. Çalışmalarımızda 20 µl hücre süspansiyonu ile 20 µl %0,5'lik tripan mavisi karıştırılmış ve bu karışımdan 20 µl alınarak lamlarda sayım yapıldı. Sayım sonucunda canlı-cansız hücre, toplam hücre ve hücre canlılık oranı belirlendi.

3.4.2.6. MTT Yöntemi

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolylblue) yöntemi hücrelerde meydana gelen sitotoksiteyi ortaya koyan kantitatif bir yöntemdir. Hücre proliferasyonuna bağlı olarak hücre canlılığını sayısal olarak ölçen bir yöntemdir. Bu yöntem ile MTT tuzu canlı hücrelerde dehidrojenaz enzim aktivitesi ile indirgenerek mor renkte formazan kristalleri oluşturur. Bu tepkimenin gerçekleşebilmesi için mitokondriyal redüktaz enzimlerinin aktif olması gerekmektedir. Böylece canlı hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak formazan kristallerinin sayısının artması cansız hücrelerde ise formazan kristallerinin oluşmaması beklenmektedir. Bu nedenle formazan kristallerinin oluşması ya da oluşmamasından kaynaklı kuyucuklarda meydana gelen renk değişimi spektrofotometrede ölçülerek analiz edildi (Li ve Song, 2007); (Stockert vd., 2012).

3.4.2.6.1. MTT Yöntemi ile MDA-MB-231 Hücreleri Üzerinde *Cladonia furcata* likeninde LD₅₀ Belirlenmesi

- Hücre ekimi için 96'lık plaklar kullanıldı ve 1×10^4 hücre olacak şekilde kuyucuklara eşit bir şekilde ekim yapılmasının ardından hücrelerin çoğalması için inkübatöre bırakıldı.
- 24 saat inkübasyonun ardından hücrelere *C. furcata* dozları uygulandı. *C. furcata* doz oranları 200 µg/mL, 120 µg/mL, 60 µg/mL, 30 µg/mL, 10µg/mL olacak şekilde besiyeri ile dilüsyonları yapıldı ve kontrol grubu oluşturularak çalışıldı.
- Kontrol için sadece uygulama grupları ile aynı hacimde besiyeri eklendi.
- Maddenin etki etmesi için hücre plağı inkübatöre konularak 48 saat inkübe edildi.
- MTT tuzu solüsyonu 25ul olacak şekilde her bir kuyucuğa kontrolde dahil olmak üzere eklendi ve 2.5 saat inkübasyona bırakıldı (Merck, Cell Proliferation Kit kullanılmıştır).
- Plaktaki kuyucuklara kit ile birlikte gelen tampondan 150 µl eklenmesinin ardından formazan kristallerinin çözünmesi için inkübatöre kaldırıldı.
- 2 saat sonra kuyucuklardaki farklı yoğunluklarda olan formazonların 570 nm absorbansta mikropalak okuyucu spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı.
- Liken uygulama gruplarının absorbans değerleri ile kontrol grubu karşılaştırılarak hücreler üzerindeki LD₅₀ dozu belirlendi. LD₅₀ değeri 60 µg/mL belirlendi.

3.4.3. DNA Hasarının Tespit Edilmesi

3.4.3.1. Komet Testi Yöntemi

- MDA-MB-231 hücreleri tripsin ile flask yüzeyinden kaldırıldı ve hücre sayımı thoma lamında yapıldı.
- Hücreler 6 kuyucuklu plaklara ekildi ve 1 gece inkübatöre kaldırıldı.
- Liken uygulama grupları 200 µg/mL, 120 µg/mL, 60 µg/mL, 30 µg/mL, 10 µg/mL olacak şekilde sırasıyla eklenip 2 gece inkübatörde inkübe edildi.

-Her bir liken uygulama grubu ve kontrolden alınan örnekler 1:1 oranda agaroz (LMA) ile pipet edildi ve lamlara yayılıp lamelle kapatıldı. Donması için +4°C’de 20 dakika bekletildi.

-Lamların üzerindeki lameller çıkarıldıktan sonra donmuş agaroz içerisindeki hücrelere lizis çözeltisi ile 60 dakika muamele edildi.

-Elektroforez tankına yerleştirilen lamlar 250 voltta elektroforez sıvısı içerisinde kopan DNA’lar yürütüldü.

-Nötralizasyon işlemi için dH₂O bulunan şalelere dizilen lamlar 3 kez yıkandı.

-Son olarak lamlar EtBr ile boyanıp floresan mikroskopunda fotoğrafı çekildi.

-Kontrol ve liken uygulama gruplarında meydana gelen DNA hasarı, % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti istatistiksel verileri BAB programında belirlendi (Azqueta vd., 2020).

3.4.4. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi

“Bioassay Technology Laboratory ELISA Kit” kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi. Hücreler flasklara ekilip 24 saat inkübe edilmesinin ardından liken uygulama grupları ilave edildi. İki gece inkübe olan hücreler tripsin ile kaldırıldı ve 15 dakika 1500 rpm’de santrifüj edildi (Borek, 2004).

Bioassay Technology Laboratory ELISA Kit içerisinde çıkan prosedüre göre ilk olarak standartlar hazırlandı, kit içerisinde çıkan 96’lık plakaya 50 µl standart eklendi. Diğer kuyucuklara ise liken uygulama gruplarından 40 µl eklendi. Hemen ardından uygulama gruplarının üzerine 10 µl anti-MDA eklendi.

Standart ve numune kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklenip 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra tüm kuyucuklar 3 kez 0,35 ml yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyuya 50 µl standart solüsyon A ve 50 µl standart solüsyon B eklenip 37°C 10 dakika inkübe edildi. Son olarak her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu ilave edilip mikropilaka okuyucu 450 nm’ye ayarlanarak ölçüm yapıldı.

3.4.5. SOD, CAT ve GPx Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD, CAT ve GPx enzim aktivitesinin belirlenmesinde Bioassay Technology Laboratory ELISA Kit kullanıldı.

Hücreler flasklara ekilip 24 saat inkübe edilmesinin ardından liken uygulama grupları ilave edildi. İki gece inkübe olan hücreler tripsin ile kaldırıldı ve 15 dakika 1500 rpm’de santrifüj edildi (Borek, 2004).

Bioassay Technology Laboratory ELISA Kit içerisinde çıkan prosedüre göre ilk olarak standartlar hazırlandı, kit içerisinde çıkan 96’lık plakaya 50 µl standart eklendi. Diğer kuyucuklara ise liken uygulama gruplarından 40 µl eklendi. Hemen ardından uygulama gruplarının üzerine 10 µl anti-SOD-CAT-GPX her bir plaka için ayrı ayrı eklendi.

Standart ve numune kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklenip 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra tüm kuyucuklar 3 kez 0,35 ml yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyuya 50 µl standart solüsyon A ve 50 µl standart solüsyon B eklenip 37°C 10 dakika inkübe edildi. Son olarak her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu ilave edilip mikrolaka okuyucu 450 nm’ye ayarlanarak ölçüm yapıldı.

3.4.6. Akridin Oranj/Etidyum Bromid (AO/EB) çift boyama

Akridin oranj boyası hücre içerisindeki canlı ve ölü hücreleri boyarken Etidyum Bromür boyası ile membran yapısı bozulmuş cansız hücreleri boyanmaktadır. Sağlıklı hücreler yeşil renkte gözlemlenirler aynı zamanda DNA’sı parçalanmaya başlayan membran bütünlüğü fazla hasar almamış hücreler erken apoptotik olarak adlandırılır ve yeşil renkte görünürler (Gülbüz vd., 2011); (Ribble vd., 2005).

Çekirdeği turuncu renkte gözlemlenen kromatini yoğunlaşmış hücreler geç apoptotik olarak adlandırılırlar ve nekroza uğrayan bir hücrenin çekirdeği turuncu olarak mikroskop altında parlak bir ışımaya vermektedir (Takahashi vd., 2004); (Nikhil ve Verma, 2013).

Çalışmada hücre ekimi için 96'lık plaka kullanıldı. Hücrelerin 24 saat inkübasyonundan sonra liken uygulama grupları ilave edilip 2 gece inkübatörde bekletildi. Trypsin ile kaldırılan hücreler 1:1 oranda karıştırılan boya ile pipet edilip lamlara serildi lamel ile kapatılıp 10 dakika karanlıkta bekletildi.

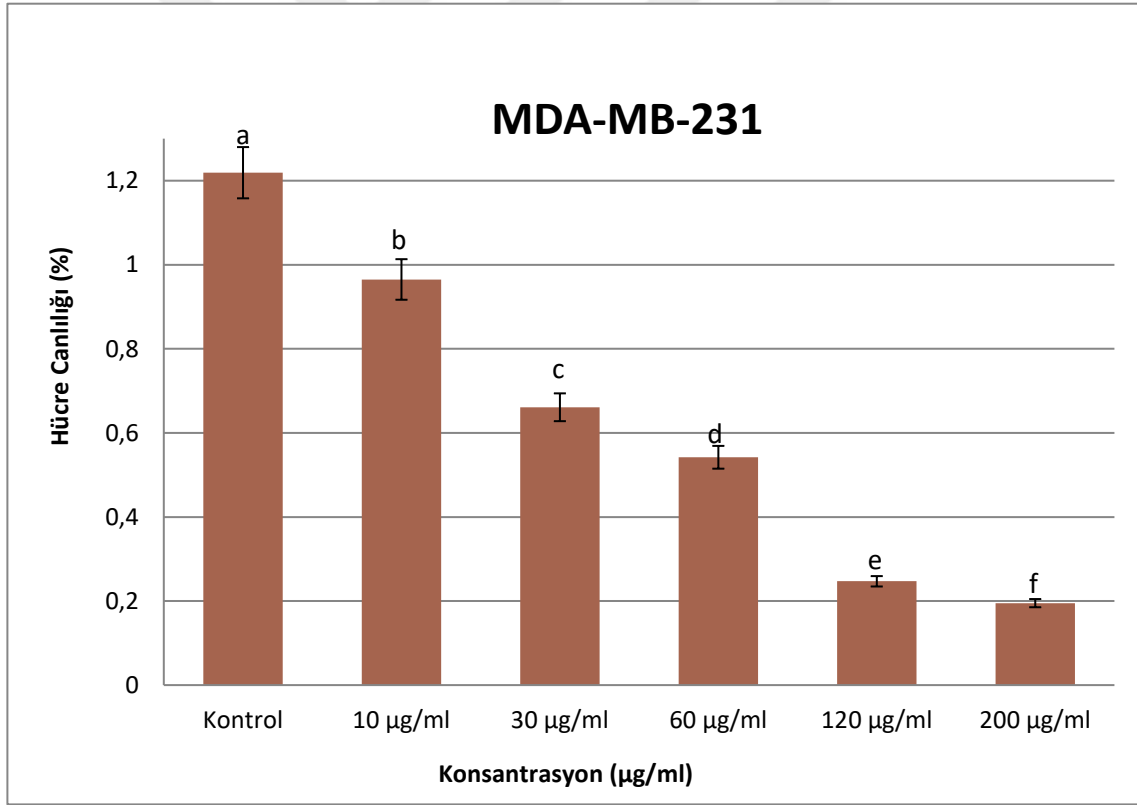
Uygulama gruplarının apoptotik hücre ölümündeki rolü ve kontrol hücrelerinin durumu, hücre membranı ve nükleusta meydana gelen değişimleri değerlendirmek için AO/EB ile çift boyandı. Boyama işleminden sonra floresan mikroskop altında incelendi.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. MTT Testi Sonuçları

Kontrol grubuna sadece besiyeri verildi ve hücrelerin sağlıklı konfülent, canlı yapıda olduğu kabul edilerek cihazdan elde edilen sonuçlar neticesinde likenin artan uygulama gruplarının spektrofotometre ölçüm sonuçlarında *Cladonia furcata*'nın MDA-MB-231 hücrelerinde çoğalmasını azalttığı, kansere karşı koruyucu bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Hücrelerdeki canlılığın kontrole kıyasla yarıya düştüğü LD₅₀ değeri 60 µg/mL olarak belirlendi. Sonuçlar alınırken blank göz ardı edilmemiş olup değerlerden çıkarılarak belirlendi.



Şekil 4.1. *Cladonia furcata*'nın MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

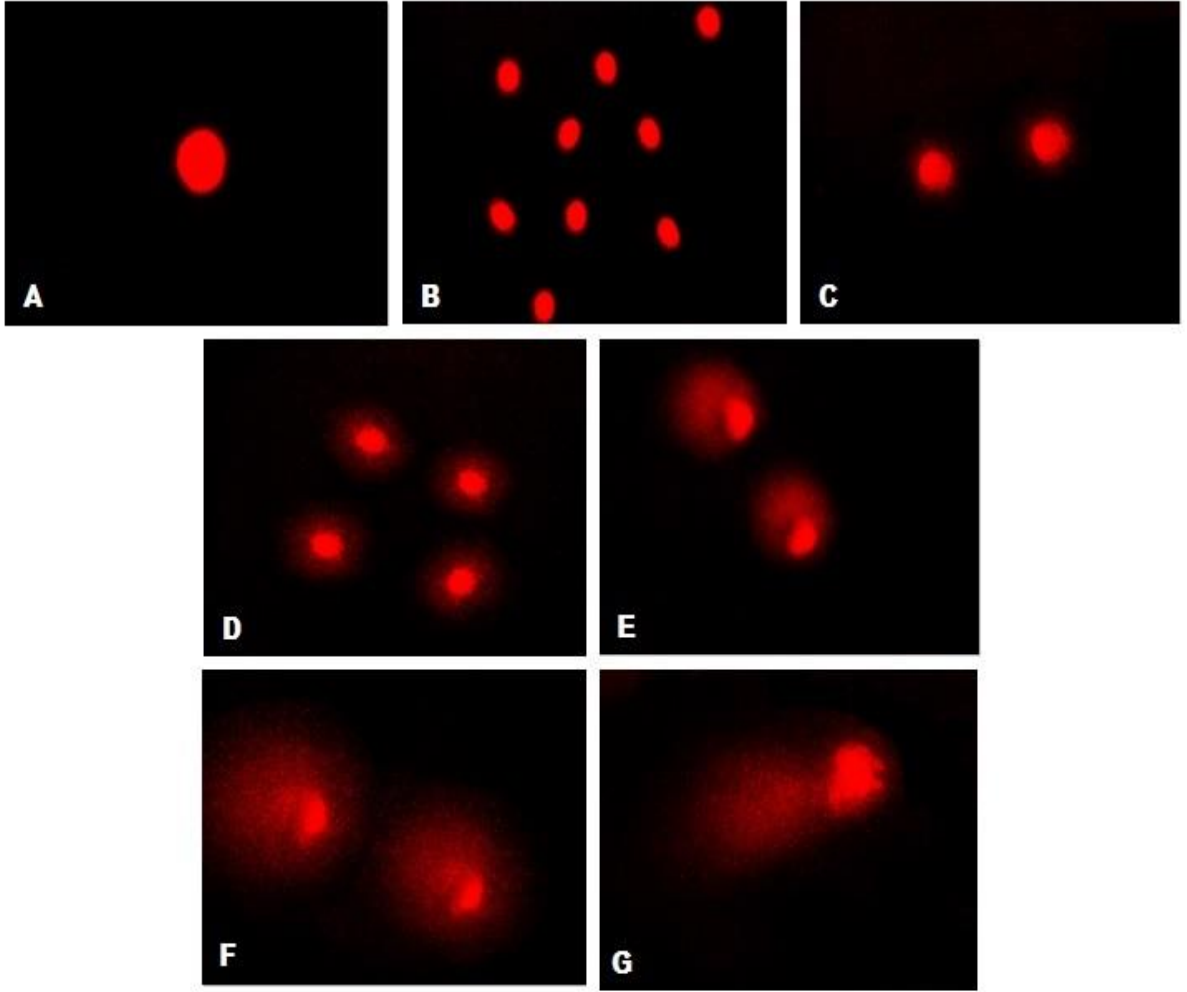
4.2. Komet Testi Analiz Sonuçları

Çalışmamızda, *Cladonia furcata*'nın 5 farklı konsantrasyonlarına (10 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml, 120 µg/ml ve 200 µg/ml) maruz bırakılan MDA-MB-231 hücre hatlarının genotoksisite ölçümleri komet testi ile sağlandı. Her farklı örnek için ayrı ayrı ölçümler BAB uygulamasının genetik aracı kullanılarak kontrol ve liken uygulama gruplarında DNA hasarı ($\pm$ SD) % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti hesaplandı.

Liken uygulama gruplarının komet testi sonucunda MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen istatistiksel sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Floresan mikroskop altında çekilen fotoğraflar ise Şekil 4.2'de verilmiştir. Liken uygulama gruplarının farklı konsantrasyonları ile kontrol grubu kıyaslandığında MDA-MB-231 hücrelerinde DNA hasarı meydana geldiği tespit edildi.

Tablo 4.1. MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında DNA hasarının ($\pm$ SD) % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin ortalama değerleri

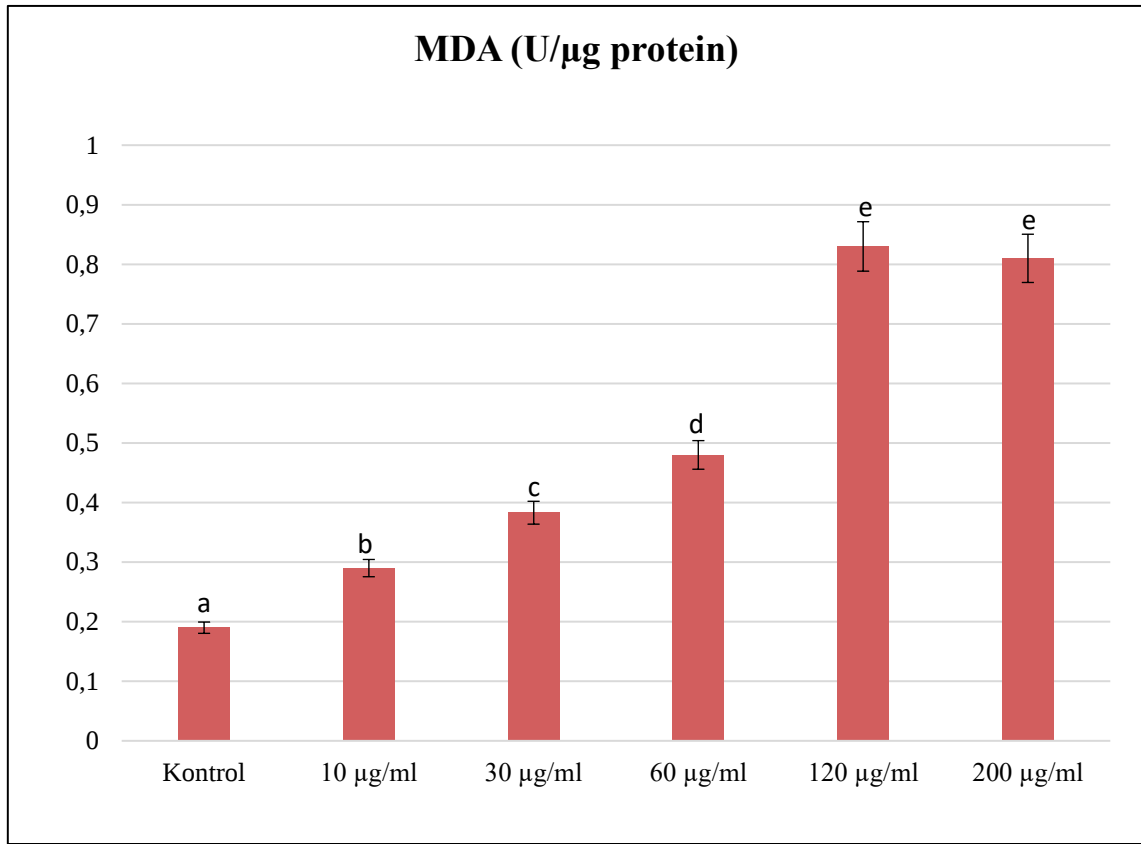
Gruplar	Kuyruk DNA % $\pm$ SD	Kuyruk Uzunluğu $\pm$ SD	Kuyruk Momenti $\pm$ SD
Kontrol	9.2 $\pm$ 1.9	1.6 $\pm$ 0.02	0,14 $\pm$ 0,0003
10 µg/mL	15.7 $\pm$ 3.4	9.02 $\pm$ 1.15	1,41 $\pm$ 0.39
30 µg/mL	28.3 $\pm$ 5.7	12.44 $\pm$ 2.12	3.52 $\pm$ 0.12
60 µg/mL	41.11 $\pm$ 8.3	18.42 $\pm$ 1.32	7.57 $\pm$ 0,10
120 µg/mL	86.7 $\pm$ 15.2	21.01 $\pm$ 2.23	18.21 $\pm$ 0.33
200 µg/mL	98.4 $\pm$ 21	24.78 $\pm$ 3.11	24.38 $\pm$ 0.65



Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücrelerinin liken uygulama grupları ve floresan mikroskop ile çekilen fotoğrafları. Kontrol grubu (A, B), 10 $\mu\text{g/mL}$ liken uygulanan grup (C), 30 $\mu\text{g/mL}$ liken uygulanan grup (D), 60 $\mu\text{g/mL}$ liken uygulanan grup (E), 120 $\mu\text{g/mL}$ liken uygulanan grup (F), 200 $\mu\text{g/mL}$ liken uygulanan grup (G).

4.3. MDA Seviyesinin değeriendirilmesi

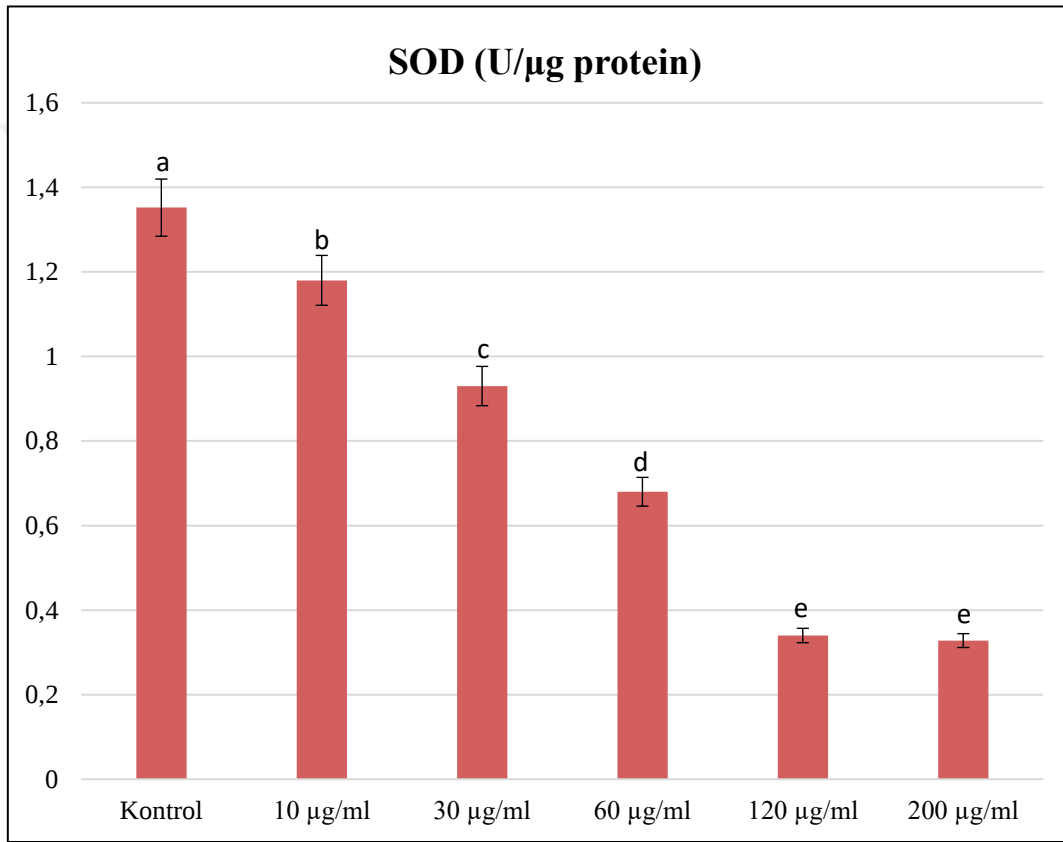
MDA-MB-231 hücrelerine artan dozlarda uygulanan *Cladonia furcata* likeninin MDA değeriendirme sonuçlarına bakıldığında kontrol ile kıyaslama yapılarak MDA seviyesini oldukça büyük miktarda artırdığı tespit edildi ($P<0,05$). Sonuçlar Şekil 4,3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarının MDA seviyeleri (Sütunlar üzerindeki aynı harfleri taşımayan gruplar birbiri arasındaki farklılığı ($P<0.05$) ifade etmektedir).

4.4. SOD Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

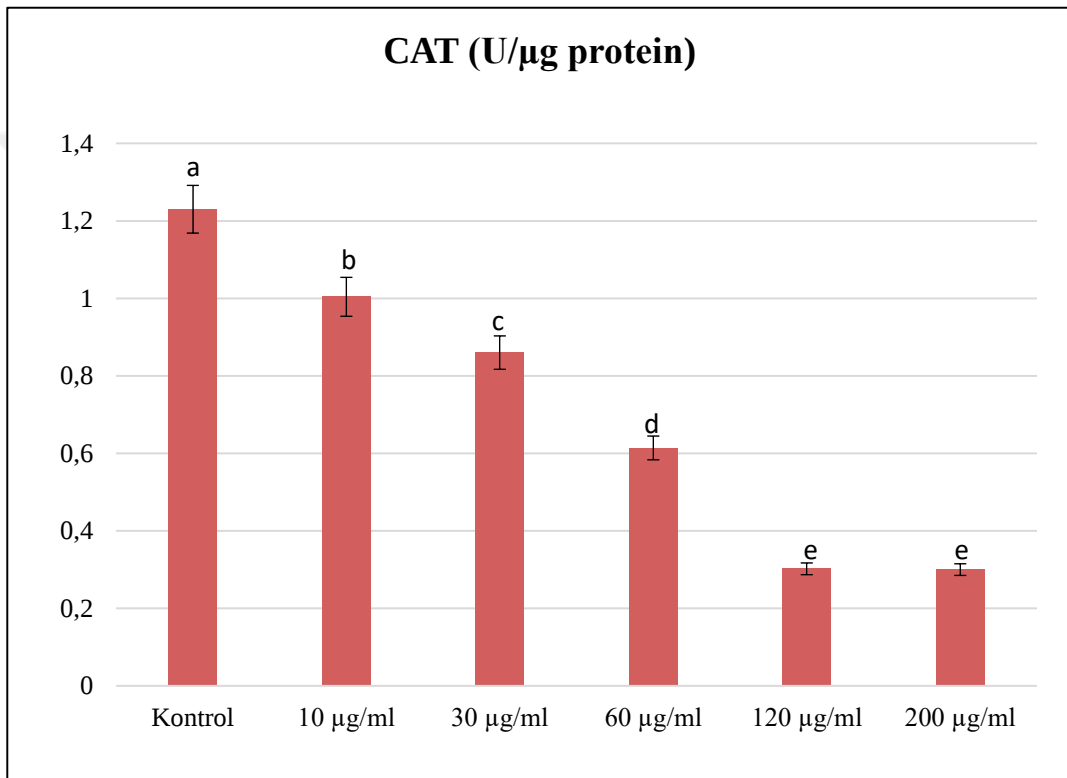
MDA-MB-231 hücrelerine artan dozlarda uygulanan *Cladonia furcata* likeninin SOD değerlendirme sonuçlarına bakıldığında kontrol ile kıyaslama yapılarak SOD enzim aktivitesini düşürdüğü tespit edildi. ($P<0,05$) SOD enzim aktivitesindeki sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarının SOD enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. (Sütunlar üzerindeki aynı harfleri taşımayan gruplar birbiri arasındaki farklılığı ($P<0.05$) ifade etmektedir).

4.5. CAT Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

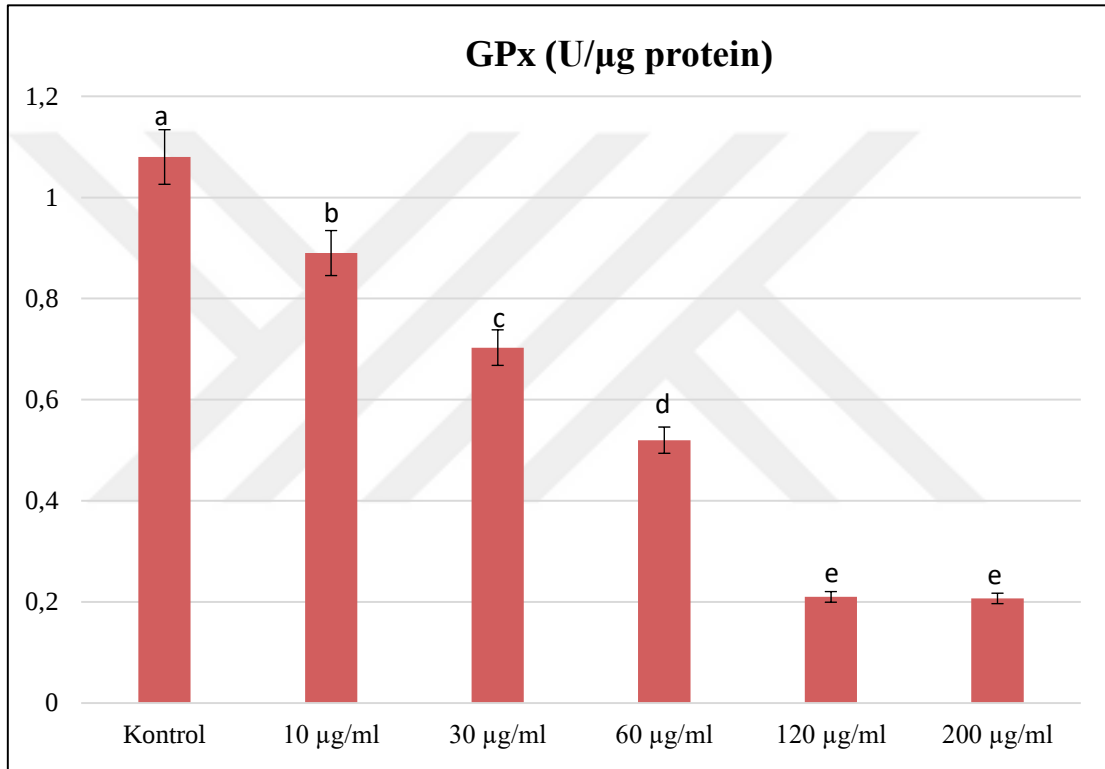
MDA-MB-231 hücrelerine artan dozlarda uygulanan *Cladonia furcata* likeninin CAT değerlendirme sonuçlarına bakıldığında kontrol ile kıyaslama yapılarak CAT enzim aktivitesini düşürdüğü tespit edildi. ($P<0,05$) CAT enzim aktivitesindeki sonuçlar Şekil 4,5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarının CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. (Sütunlar üzerindeki aynı harfleri taşımayan gruplar birbiri arasındaki farklılığı ($P<0.05$) ifade etmektedir, aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır).

4.6. GPx Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

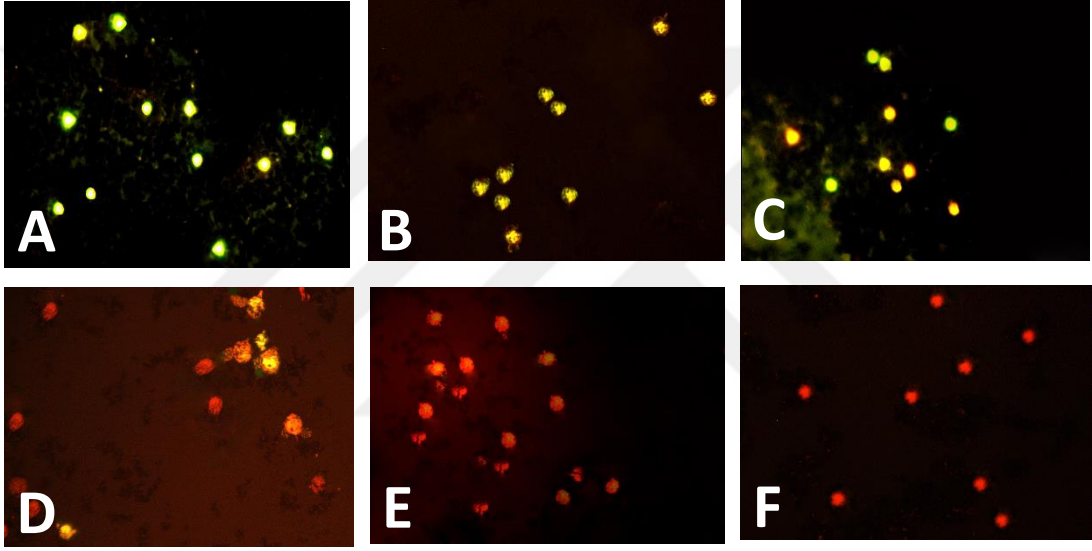
MDA-MB-231 hücrelerine artan dozlarda uygulanan *Cladonia furcata* likeninin GPx değerlendirme sonuçlarına bakıldığında kontrol ile kıyaslama yapılarak GPx enzim aktivitesini düşürdüğü tespit edildi. ($P<0,05$) GPx enzim aktivitesindeki sonuçlar Şekil 4,6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarının GPx enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. (Sütunlar üzerindeki aynı harfleri taşımayan gruplar birbiri arasındaki farklılığı ($P<0,05$) ifade etmektedir, aynı harfteki gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır).

4.7. Akridin oranj - etidyum bromür boyası ile Apoptoz Saptanması

Hücre ölümünün olduğu dozlarda hücrenin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ölüm tiplerinden hangisi ile hangi oranda öldüğünü belirlemek için hücreler akridin oranj/etidyum bromür ile işaretlenerek floresan mikroskobunda görüntülendi. Çalışmalar esnasında farklı konsantrasyonlardaki liken uygulama gruplarından boyama sonrası elde edilen görüntüler Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Apoptotik hücrelerin floresan mikroskobunda görüntüsü. Kontrol grubu (A), 10 $\mu\text{g/mL}$ *C. furcata* uygulanan grup (B), 30 $\mu\text{g/mL}$ *C. furcata* uygulanan grup (C), 60 $\mu\text{g/mL}$ *C. furcata* uygulanan grup (D), 120 $\mu\text{g/mL}$ *C. furcata* uygulanan grup (E), 200 $\mu\text{g/mL}$ *C. furcata* uygulanan grup (F).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser dünya ve ülkemizde prevalansı giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunu olması yanında fiziksel, psikososyal ve ekonomik birçok sıkıntıya yol açan kronik bir hastalık olarak görülmektedir (Yastıbaş ve Dirik, 2018); (Ergin, Özdilek ve Dutucu, 2019). Dünya genelinde 2016 yılında 17,2 milyon kanser vakası ve 8,9 milyon kansere bağlı ölüm olduğu belirlenmiştir. Mortaliteye en çok neden olan kanser türleri sırası ile meme, solunum sistemi ve kolorektal kanserleri olup özellikle kanser gelişim riskinin cinsiyetler arası farklılık gösterdiği bilinmektedir. Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre 2020 yılındaki kanser hızı erkeklerde yüz binde 291,5 iken kadınlarda bu oran yüz binde 188,0'dır. Ülkemizdeki kadınlarda görülen ilk beş kanser türü, dünyadaki pek çok ülke verileri ile benzerlik göstermekte olup bunların meme, triod, kolorektal, uterus korpusu ve solunum kanserleri olduğu belirlenmiştir (Bray vd., 2018); (Siegel ve Miller, 2019); (T.C. Sağlık Bakanlığı. (2020)).

Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonunun ülkemizde 20 bin kadın üzerinde yürüttüğü çok merkezli araştırmada meme kanseri görülme yaşı 51; 40 yaşından küçük hasta oranı %16,6, premenopozal hasta oranı % 37.2, nullipar hasta oranı %13,6 olarak saptanmıştır (V. Özmen, T. Özmen ve Doğru, 2019).

Meme kanserini ortaya çıkaran belirtilere sahip olan kişiler riskli hasta olarak adlandırılmaktadırlar. Araştırmalar neticesinde sağlıklı bir yaşam ve kanser faktörlerinden uzaklaşmak hastalığın riskini yarıya yarıya azalttığı ortaya konulmuştur (Colditz ve Bohlke, 2014).

Likenler, bir mantar partneri ve bir alg veya Siyanobakteri olan bir fotosentetik organizmadan oluşan simbiyotik organizmalardır (Bethencourt vd., 2018). Likenler yüzlerce yıldır birçok ülkede insan hastalıklarının tedavisi için kullanılmaktadır. Yeni çalışmalar, bu yavaş büyüyen organizmaların, farklı biyolojik aktivitelere sahip çok çeşitli ikincil metabolitler ürettiğini ortaya koymuştur (Grube ve Berg, 2009).

Bu türün özlerinin *in vitro* olarak lösemi hücrelerini öldürdüğü gösterilmiştir. *C. furcata*'dan izole edilen polisakkaritlerin insan lösemi K562 hücrelerinde hücre ölümünü (apoptoz) indüklediği gösterilmiştir (Lin vd., 2001).

Ayrıca, yapılan bir çalışmada *C. furcata* polisakkaritleri, bazı kanser hücrelerinin önlemesine yardımcı olan bir enzim olan telomerazın aktivitesini azalttı; bu aktivite, kanser tedavisinde olası terapötik potansiyele işaret etmektedir (Lin vd., 2003).

Likenler, farmakolojik potansiyele sahip olabilecek biyolojik olarak aktif enzimler, polisakkaritler ve yağ asitleri kaynağı olarak da tanımlanmıştır (Huneck ve Yoshimura, 1996); (Culberson, 1969).

Galloway, 1996 yılında likenlerin dünyanın çoğu karasal ekosisteminde ve liken maddelerinin geniş bir antikanser aktivitesinde bulunabilecek kadar evrimsel bir başarı elde ettiklerini bildirmiştir (Galloway, 1996).

Likenlerin savunmacı doğası, çok çeşitli kanserlere karşı mükemmel bir anti-kanser potansiyeline sahip oldukları için farmasötik açıdan çok önemli bir noktadır (Zambare, 2012). Anti-kanseröz aktiviteye sahip birkaç sekonder metabolit, çeşitli *in vitro* kanser modellerinde etkili bir şekilde hareket etmektedir (Solárová vd., 2020).

Usnik asit *Cladonia* ve bir kaç liken cinsinin çeşitli türlerinde bulunmuştur. Kupchan ve Kopperman, Usnik asitin Lewis akciğer karsinomu için *in vitro* anti-kanserojenik etkilerini ilk kez göstermiştir (Campanella vd., 2002).

Bir yayında FRAP ile spektrofotometrik teknik, *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Lasallia pustulata* (L.) Mérat'ın aseton, metanolik ve sulu ekstraktlarının antioksidan aktivite değerlendirmesinde her bir liken türünün antioksidan aktivitesi olduğu ancak en yüksek etkinliğe sahip türün *Hypogymnia physodes* olduğu tespit edilmiştir (Kosanić, Ranković ve Vukojević, 2011).

Cladonia furcata sekonder metabolit olarak atranorin ve fumarprotocetrarik asit içerir (Culberson, 1969). Bununla birlikte, likensilerin tümör hücrelerinde apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu tez çalışmasındaki akciğer kanseri ve meme kanseri tümörleri üzerine etki eden liken uygulama grupları ile apoptoz ve nekroz çalışılmıştır.

2009 yılında yapılan bir çalışmada, *C. furcata*'nın aseton ve metanol ekstraktlarının *Bacillus mycoides*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*'u inhibe ettiğini, ancak *C. furcata*'nın sulu ekstraktının test mikroorganizmalarına karşı etkisiz olduğunu ortaya koymuştur (Ranković, Mišić ve Sukdolak, 2007).

Lin ve arkadaşlarının insan lösemi hücrelerinde yaptığı bir çalışmaya göre, *in vitro* olarak *C. furcata* ile tedavi edilen K562 hücrelerinde apoptoz oluşumunu güçlü bir şekilde göstermiştir. Kromatinde yoğunlaşma, nükleer parçalanma ve apoptotik cisimler gibi hücre morfolojisindeki değişiklikler, apoptozun en güvenilir belirtici olmuştur (Lin vd., 2003).

Apoptoz, karakteristik bir morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişim modeli tarafından tanınan spesifik bir hücre ölümü modudur. Bu hücre ölümü modu, son zamanlarda onkolojinin ilgi odağı haline gelmiştir (Marx, 1993).

Meme kanserinin tedavisindeki önemli ilerlemelere rağmen, bu hastalık kanser ölümlerinden ikinci sırada yer almaktadır. Yapılan araştırmalarda 250'den fazla vaka incelenmiş olup diyetel fitokimyasalların, liflerin tüketimi arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir (Borek, 2004). Araştırmalar sonucunda *C. furcata* likeninin K562 hücre proliferasyonunu üzerinde inhibe edici etkisi MTT testi ile kanıtlanmıştır (Lin vd., 2001).

Bu araştırmada insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'e *C. furcata* metanol ekstratı uygulandı ve MTT canlılık testi ile kanserli hücreler üzerinde oluşturmuş olduğu sitotoksiste ile etkisi tespit edildi. *C. furcata*'nın 10 ve 30 µg/ml'lik uygulama gruplarında da hücre canlılığının azaldığı gözlemlendi ancak hücrelerin %50'sinin öldüğü değer olan

LD₅₀ değeri 60 µg/ml olarak tespit edildi. Hücrelerin tamamını öldüren LD₁₀₀ değeri ise 120 µg/ml olarak tespit edildi. MTT sonuçlarımız Z. Kocakaya ve ark. sonuçları ile korelasyon göstermektedir ve bu çalışma ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Kocakaya, M. Kocakaya ve Şeker, 2021). Genotoksik olarak DNA hasarının ölçümünde komet testi kullanılmıştır. Tek ve çift sarmal kırıklarını, alkali kararsız bölgeleri hatalı onarım yerlerini ortaya çıkarır (Burlinson, 2007). Çalışmamızda artan dozlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan *C. furcata*, kanserli hücrelerde DNA hasar oluşumuna neden olup liken uygulama gruplarının kanser üzerine koruyucu bir etki sergilediğini ortaya koydu. Artan doza bağlı gerçekleşen kuyruk miktarındaki artış ve hücre sayısındaki azalış kontrole kıyasla en anlamlı ve üstün etkiyi 60 µg/ml konsantrasyonundaki doz ile göstermiştir.

SOD, süperoksit radikalinin O₂ ve H₂O₂'ye dismutasyonunu katalizleyen enzimatik bir antioksidandır (Young ve Woodside); (Willoughby ve Truelove, 2001). Bu tez çalışmasında *C. furcata* uygulanan grubun SOD aktivitesi kontrol grubuyla kıyaslandığında, SOD aktivitesinde bir düşüş meydana geldiği tespit edilmiştir.

H₂O₂ hücreler için toksik bir etkiye sahip olan reaktif oksijen bileşiği olup ortamdan CAT ve GPx tarafından uzaklaştırılır. CAT enzim aktivitesi H₂O₂'nin su ve oksijene bozunmasını sağlamaktadır (Limón-Pacheco ve Gonsebatt, 2009). Bu tez çalışmasında *C. furcata* uygulanan grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile 10 µg/ml liken uygulama grubu arasında CAT aktivitesinde istatistiksel olarak büyük bir değişim göstermezken diğer uygulama gruplarında kontrole kıyasla oldukça büyük bir düşüş meydana geldiği tespit edilmiştir. CAT enzimidaki seviyenin düşmesi hücrelerde enzimlerin etki edeceği H₂O₂ birikimine karşı etkisinin azalması yönünde güçlü bir olasılığı da akla getirmektedir.

GPx; H₂O₂'nin hidroksil radikali oluşturmaya engel olmak için GSH kullanan ve sonucunda GSSG ve H₂O oluşturan enzimatik bir antioksidandır (Sen vd., 2010). Hücre içerisinde CAT, H₂O₂'nin yüksek miktarlarında rol oynarken, GPx düşük konsantrasyonlarda daha etkindir (Willoughby, 1980). Bu tez çalışmasında, liken uygulama gruplarının GPx aktivitesi bakımından kontrol grubu ile kıyaslandığında, GPx

aktivitesinde bir düşüş meydana geldiği tespit edildi. Böylece H₂O₂ miktarının düşük seviyelerini artırdığı düşünülmüştür.

MDA, hücre zarında bulunan bileşiklerin bağlanmasını bozarak iyon geçirgenliğini değişimini olumsuz etkileyerek hücre içinde zincir reaksiyonları gibi sonuçlara neden olmaktadır (Monaghan, Metcalfe ve Torres, 2009). Yaptığımız bu tez çalışmasında *C. furcata*'nın en yüksek miktarda uygulanan hücrelerindeki antioksidan aktivite seviyelerinden farklı olarak lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA değerlerinde bir artış olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak *Cladonia furcata*'ya ait liken ekstresi meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerine uygulanmıştır. MTT yöntemi ile yüksek dozlarda canlı hücrelerde ölüme sebep olduğu ve komet yöntemi ile yine artan dozlarda meme kanseri hücre hattı DNA'sı üzerinde hasar oluşumuna sebep olduğu belirlendi. Ayrıca *C. furcata*'nın; MDA-MB-231 hücrelerindeki SOD, CAT, GPx enzim etkinliğini düşürdüğü ve MDA değerlerini oldukça artırdığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA sonuçları beraber değerlendirildiğinde *C. furcata* uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde enzimatik etkinliği düşürdüğü belirlendi.

Apoptoz nekroz bakımından MDA-MB-231 hücreleri üzerine uygulanan *C. furcata* likeninin artan dozlarda uygulama grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hücre ölümünün doza bağlı olarak artışı tespit edilmiştir. Artan dozlarda *C. furcata* likeni uygulama grupları ile kontrol kıyaslandığında LD₅₀ değerinin 60 µg/ml'lik dozda olduğu, hücrelerin tamamının öldüğü LD₁₀₀ dozun ise 120 µg/ml'lik dozda olduğu MTT testi sonuçlarıyla birlikte doğrulanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abdullaev, F. I., Riveron-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Hernández, J. M., Perez-Lopez, I., Pereda-Miranda, R., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2003). Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology in vitro*, 17(5-6), 731-736.
- Ahti, T., & Sipman, H. J. (2013). Ten new species of *Cladonia* (Cladoniaceae, Lichenized Fungi) from the Guianas and Venezuela, South America. *Phytotaxa*, 93(1), 25-39.
- Altun D. *Usnea longissima* Ach. Likeninin *Drosophila Melanogaster*' İın Çeşitli Gelişim Parametreleri ve Ömür Uzunluğu Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum: 2007.
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., & Bray, F. (2020). Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e191-e203.
- Arıcıoğlu, A., Aydın, S., Turkozkan, N., & Durmus, O. (1994). The effect of allopurinol on Na⁺ K⁺ ATPase related lipid peroxidation in ischemic and reperfused rabbit kidney. *General Pharmacology: The Vascular System*, 25(2), 341-344.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- Azqueta, A., Ladeira, C., Giovannelli, L., Boutet-Robinet, E., Bonassi, S., Neri, M., ... & Møller, P. (2020). Application of the comet assay in human biomonitoring: An comet perspective. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 783, 108288.
- Bethencourt, M., Fernández-Montblanc, T., Izquierdo, A., González-Duarte, M. M., & Muñoz-Mas, C. (2018). Study of the influence of physical, chemical and biological conditions that influence the deterioration and protection of Underwater Cultural Heritage. *Science of the Total Environment*, 613, 98-114.

- Borek, C. (2004). Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative cancer therapies*, 3(4), 333-341.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Brouckaert, P., Takahashi, N., van Tiel, S. T., Hostens, J., Eggermont, A. M., Seynhaeve, A. L., ... & ten Hagen, T. L. (2004). Tumor necrosis factor- α augmented tumor response in B16BL6 melanoma-bearing mice treated with stealth liposomal doxorubicin (Doxil) correlates with altered Doxil pharmacokinetics. *International journal of cancer*, 109(3), 442-448.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R., & Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe?. *Breast cancer research*, 5(2), 1-7.
- Campanella, L., Delfini, M., Ercole, P., Iacoangeli, A., & Risuleo, G. (2002). Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. *Biochimie*, 84(4), 329-334.
- Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J., & Roussel, M. F. (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 1091-1096.
- Colditz, G. A., & Bohlke, K. (2014). Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(3), 186-194.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249-261.
- Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., ... & Bonassi, S. (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the

- ComNet project. Mutation research/reviews in mutation research, 759, 27-39.
- Columbano, A. (1995). Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *Journal of cellular biochemistry*, 58(2), 181-190.
- Comporti, M. (1993). Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Molecular aspects of medicine*, 14(3), 199-207.
- Culberson, W. L. (1969). The use of chemistry in the systematics of the lichens. *Taxon*, 18(2), 152-166.
- Dohr, O., Vogel, C., & Abel, J. (1995). Different response of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 321(2), 405-412.
- Draper, H. H. (1990). Nutritional modulation of oxygen radical pathology. *Advances in nutritional research*, 119-145.
- Eising, R., Trelease, R. N., & Ni, W. (1990). Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278(1), 258-264.
- Erdoğan, B. B., & Uzaslan, E. K. (2003). Apoptozis Mekanizmaları: Fas-FasL Bağımlı Apoptozis. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı.
- Ergin, A., Özdilek, R., & Dutucu, N. (2019). 2012-2017 yılları arasında kadınlarda görülen kanser türleri ve dağılımları: bir üniversite hastanesi örneği. *Kadın Sağlığı Hemşireliği Dergisi*, 5(1), 1-21.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., & Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews genetics*, 7(1), 21-33.
- Flatt, P. M., & Pietenpol, J. A. (2000). Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the

- crossroads of carcinogenesis and drug discovery. *Drug metabolism reviews*, 32(3-4), 283-305.
- Frankel, E. N., & Neff, W. E. (1983). Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 754(3), 264-270.
- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., & Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. *Nature*, 409(6822), 850-852.
- Galloway, D. J. (1996). Lichen biogeography. *Lichen biology*, 2, 315-35.
- Goga, M., Antreich, S. J., Bačkor, M., Weckwerth, W., & Lang, I. (2017). Lichen secondary metabolites affect growth of *Physcomitrella patens* by allelopathy. *Protoplasma*, 254(3), 1307-1315.
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 37-43.
- Gotzsche, P. C., & Olsen, O. (2000). Is screening for breast cancer with mammography justifiable? *The Lancet*, 355(9198), 129-134.
- Grube, M., & Berg, G. (2009). Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal biology reviews*, 23(3), 72-85.
- Guimaraes, C., & Linden, R. (2004). Programmed cell deaths: apoptosis and alternative deathstyles. *European journal of biochemistry*, 271(9), 1638-1650.
- Gürbüz, V., Yilmaz, A., Gökçe, Ö., & Konaç, E. (2011). İnsan kolon kanser hücre hattında (ht29) cisplatin'in apoptotik etkisi. *Marmara Medical Journal*, 24(2), 100-105.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical society transactions*, 35(5), 1147-1150.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85.
- Higashi, T., Kawamata, F., & Sakamoto, T. (1974). Studies on Rat Liver Catalase: VII.

- Double-labeling of Catalase by ^{14}C -Leucine and ^3H - δ -Aminolevulinic Acid. *The Journal of Biochemistry*, 76(4), 703-708.
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*, 13(4), 1-7.
- Horobin, R., & Kiernan, J. (Eds.). (2020). *Conn's biological stains: a handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine*. Taylor & Francis.
- Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances. In *Identification of lichen substances* (pp. 11-123). *Springer, Berlin, Heidelberg*.
- Jones, G. L., & Masters, C. J. (1976). On the comparative characteristics of mammalian catalases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 55(4), 511-518.
- Kearns, W. G., & Liu, J. M. (2001). Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. *Current Genomics*, 2(2), 171-180.
- Key, T. J., Verkasalo, P. K., & Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *The lancet oncology*, 2(3), 133-140.
- Kocakaya, Z. , Kocakaya, M. & Şeker Karatoprak, G. (2021). Comparative analyses of antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of different *Cladonia* species and determination of fumarprotocetraric acid amounts. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24 (6), 1196-1207 .
- Kocakaya, M. ve Kocakaya, Z. (2022). Türkiye’de Yayılış Gösteren *Cladonia furcata* grup üyeleri ve deskripsiyonları. H. Sağlık (Ed.). *Fen Bilimleri ve Matematik Alanında Yeni Trendler*, 353-356, İzmir: Duvar Yayınları.
- Kosanić, M., Ranković, B., & Vukojević, J. (2011). Antioxidant properties of some lichen species. *Journal of food science and technology*, 48(5), 584-590.
- Lane-Claypon, J. E. (1926). A Further Report on Cancer of the Breast with Special Reference to its Associated Antecedent Conditions. *A Further Report on Cancer of*

the Breast with Special Reference to its Associated Antecedent Conditions.

- Lanir, A., & Schejter, A. (1975). On the sixth coordination position of beef liver catalase. *FEBS letters*, 55(1-2), 254-256.
- Lawrey, J. D. (1986). Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 111-122.
- Li, J., & Song, L. (2007). Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia*, 46(5), 593-599.
- Li, N. A., Deng, Y., Zhou, L., Tian, T., Yang, S., Wu, Y., ... & Dai, Z. (2019). Global burden of breast cancer and attributable risk factors in 195 countries and territories, from 1990 to 2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017. *Journal of hematology & oncology*, 12(1), 1-12.
- Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 137-147.
- Lin, X., Cai, Y. J., Li, Z. X., Chen, Q., Liu, Z. L., & Wang, R. (2003). Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of CFP-2, a novel lichenin from *Cladonia furcata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1622(2), 99-108.
- Lin, X., Cai, Y. J., Li, Z. X., Liu, Z. L., Yin, S. F., & Zhao, J. C. (2001). *Cladonia furcata* polysaccharide induced apoptosis in human leukemia K562 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22(8), 716-720.
- Liu, J., Kummerow, C. D., & Elsaesser, G. S. (2017). Identifying and analysing uncertainty structures in the TRMM microwave imager precipitation product over tropical ocean basins. *International Journal of Remote Sensing*, 38(1), 23-42.
- Liu, Z., Delavan, B., Roberts, R., & Tong, W. (2017). Lessons learned from two decades

- of anticancer drugs. *Trends in pharmacological sciences*, 38(10), 852-872.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. E. (2000). Protein sorting: organelle biogenesis and protein secretion. *Molecular cell biology*, 4, 675-750.
- Lokerse, W. J., Bolkestein, M., Dalm, S. U., Eggermont, A. M., de Jong, M., Grüll, H., & Koning, G. A. (2017). Comparing the therapeutic potential of thermosensitive liposomes and hyperthermia in two distinct subtypes of breast cancer. *Journal of controlled release*, 258, 34-42.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*, 763, 1-10.
- Marx, J. (1993). Cell Death Studies Yield Cancer Clues: The realization that malignant tumors may grow because cells don't die when they should is providing a new direction for both basic and clinical cancer research. *Science*, 259(5096), 760-761.
- Milic, M., Frustaci, A., Del Bufalo, A., Sánchez-Alarcón, J., Valencia-Quintana, R., Russo, P., & Bonassi, S. (2015). DNA damage in non-communicable diseases: A clinical and epidemiological perspective. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 776, 118-127.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B., & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters*, 12(1), 75-92.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., ... & Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*, 10(6), 515-527.
- Nguyen, V. T., Ndoeye, A., Hall, L. L., Zia, S., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., ... & Grando, S. A. (2001). Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *Journal of cell*

- science*, 114(6), 1189-1204.
- Nicotera, P., & Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 23(16), 2757-2765.
- Nikhil, S., & Verma, K. S. (2013). Laboratory evaluation of some novel insecticides against *Agrotis segetum* (Denis & Schiffermuller) fed on potato leaves. *Potato Journal*, 40(2), 109-113.
- Öktem, A., Ülger, A. C., & Kırktok, Y. (2001). Cin mısırında (*Zea mays everta* Sturt.) farklı azot dozları ve sıra üzeri mesafelerinin tane verimi ve bazı agronomik özelliklere etkisi. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16(2), 83-92.
- Özdemir, F., Bor, M., Demiral, T., & Türkan, İ. (2004). Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant growth regulation*, 42(3), 203-211.
- Özmen, V., Özmen, T., & Doğru, V. (2019). Breast cancer in Turkey; an analysis of 20.000 patients with breast cancer. *European journal of breast health*, 15(3), 141.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, 406(6797), 747-752.
- Pike, M. C., Krailo, M. D., Henderson, B. E., Casagrande, J. T., & Hoel, D. G. (1983). ‘Hormonal’ risk factors, ‘breast tissue age’ and the age-incidence of breast cancer. *Nature*, 303(5920), 767-770.
- Piñeros, M., Ginsburg, O., Bendahhou, K., Eser, S., Shelpai, W. A., Fouad, H., Znaor, A., & Staging Survey Group (2022). Staging practices and breast cancer stage among population-based registries in the MENA region. *Cancer epidemiology*, 81, 102250. Advance online publication.

- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 97: 55-74
- Purvis, O. W., Coppins, B. J., Hawksworth, D. L., James, P. W., & Moore, D. M. (1992). The lichen flora of Great Britain and Ireland. London: Natural History Museum.
- Ranković, B., Mišić, M., & Sukdolak, S. (2007). Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *British Journal of Biomedical Science*, 64(4), 143-148.
- Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2005). A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC biotechnology*, 5(1), 1-7.
- Ringer, D. P., & Schniper, L. E. (2000). Principles of cancer biology. RC Bast, DW Kufe, RE Pollock, RR Weichselbaum, JF Holland & E. Frei, *Cancer medicine*. BC Decker Inc., Hamilton, Ontario, 25-30.
- Robertson, L. K., Bowling, D. B., Mahaffey, J. P., Imiolczyk, B., & Mahaffey, J. W. (2004). An interactive network of zinc-finger proteins contributes to regionalization of the *Drosophila* embryo and establishes the domains of HOM-C protein function.
- Rojas, B., Gallego, B. I., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Valiente-Soriano, F. J., ... & Ramírez, J. M. (2014). Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *Journal of neuroinflammation*, 11(1), 1-24.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International journal of pharmaceutical sciences review and research*, 3(1), 91-100.
- Shinde, A., Ganu, J., & Naik, P. (2012). Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 1(2), 63.
- Siegel R., L., & Miller K., D. (2019). Jemal Ahmedin. Cancer statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians, 69(1), 7-34.

- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 311(1152), 617-631.
- Solárová, Z., Liskova, A., Samec, M., Kubatka, P., Büsselberg, D., & Solár, P. (2020). *Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. Biomolecules*, 10(1), 87.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, 114(8), 785-796.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- T.C. Sağlık Bakanlığı. (2020). Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 42-43, Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı.
- Takahashi, A., Masuda, A., Sun, M., Centonze, V. E., & Herman, B. (2004). Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). *Brain research bulletin*, 62(6), 497-504.
- Tosun, İ., & Karadeniz, B. (2005). Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(1), 78-83.
- Üstündağ, F. D., Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Cansız, D., Beler, M., Karagöz, A., ... & Emekli-Alturfan, E. (2022). 3-Pyridinylboronic Acid Ameliorates Rotenone-Induced Oxidative Stress Through Nrf2 Target Genes in Zebrafish Embryos. *Neurochemical Research*, 1-12.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free

- radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.
- Willingham, D. B. (1999). The neural basis of motor-skill learning. *Current Directions in Psychological Science*, 8(6), 178-182.
- Willoughby, C. P., & Truelove, S. C. (1980). Ulcerative colitis and pregnancy. *Gut*, 21(6), 469-474.
- Wu, C. T., & Morris, J. R. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293(5532), 1103-1105.
- Yamamoto, Y., Miura, Y., Higuchi, M., Kinoshita, Y., & Yoshimura, I. (1993). Using lichen tissue cultures in modern biology. *Bryologist*, 384-393.
- Yastıbaş, C., & Dirik, G. (2018). Kanser ve farkındalık temelli müdahale programları: sistematik derleme. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 10(3), 385-403.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- Zambare, V. P., & Christopher, L. P. (2012). Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50(6), 778-798.