



T.C

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*RHIZOPLACA MELANOPHTHALMA VE  
RHIZOPLACA CHRYSOLEUCA LİKEN EKSTRELERİNİN  
ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ*

ALEYNA BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA

ŞUBAT – 2024

YOZGAT

T.C  
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*RHIZOPLACA MELANOPHTHALMA* VE  
*RHIZOPLACA CHRYSOLEUCA* LİKEN EKSTRELERİNİN  
ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ALEYNA BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA

Bu çalışma Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
(BAP) Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2023-1120 kodu ile  
desteklenmiştir.

ŞUBAT – 2024

YOZGAT



**YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
LİSANSÜSTÜ TEZ ONAY FORMU**

**T.C.**

**YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Aleyna BOZKURT'un hazırladığı "*Rhizoplaca melanophthalma* ve *Rhizoplaca chrysoleuca* Liken Ekstrelerinin Antikanser Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı tezi ile ilgili tez savunma sınavı, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri gereğince 14/02/2024 Çarşamba günü saat 10:00'da yapılmış, tezin onayına oy birliği ile karar verilmiştir.

**Başkan** : Prof. Dr. Dilek PANDIR

**Jüri Üyesi** : Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA

**Jüri Üyesi** : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet CEYLAN

**ONAY:**

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı Enstitü Yönetim Kurulu Kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Prof. Dr. Ümit BUDAK**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü**

## 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.

Aleyna Bozkurt

14/02/2024

## ÖN SÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgisini ve desteklerini esirgemeyen, akademik hayatıma çok değerli katkılar sunan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım, bu yoldaki en büyük yardımcım ve destekçim olan, hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın uygulama sürecinde, yardımlarını esirgemeyen ve bilgileriyle bizlere ışık tutan sayın Prof. Dr. Dilek PANDIR'a, araştırmanın gerek hazırlık aşamasında gerekse tamamlanma sürecinde her zaman yanımda olan, laboratuvar çalışmalarında destekleriyle bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan, sonsuz sabrı ve yardımlarıyla en büyük desteği sağlayan doktora öğrencisi Derya GÜL'e ve tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca, desteklerini ve sabrını esirgemeyen, her zaman yanımda olan en büyük destekçilerim; annem Sema BOZKURT'a, babam Aykut BOZKURT'a ve kardeşim Furkan BOZKURT'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması;

Bu çalışma Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2023-1120 kodu ile desteklenmiştir. Tez çalışmamı desteklediklerinden dolayı teşekkür ederim.

Aleyna BOZKURT

14.02.2024

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### ***RHIZOPLACA MELANOPHTHALMA* VE *RHIZOPLACA CHRYSOLEUCA* LİKEN EKSTRELERİNİN ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**ALEYNA BOZKURT**

**YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA**

Likenler, mantarlar ve fotosentetik alglerden meydana gelen simbiyotik organizmalardır. Çalışılan *Rhizoplaca melanophthalma* (DC.) Leuckert & Poelt ve *Rhizoplaca chrysoleuca* (Sm.) Zopf likenlerinden elde edilen ekstrakt çözeltisinin kanser hücrelerini inhibe ettiği MTT testi ile belirlenmiştir ve *R. Melanophthalma* likeninin LC<sub>50</sub> değeri 92 µg/ml olup *R. chrysoleuca* likeninin de LC<sub>50</sub> değeri 46 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, memeli hücre kültürü olan MDA-MB-231 üzerindeki *R. melanophthalma* ve *R. chrysoleuca* ekstrakt dozlarının (23-182 µg/ml) farklı biyolojik aktivitelerinin belirlenmesidir. Bu çalışmada meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücreleri üzerinde liken uygulama gruplarının gösterdikleri biyolojik aktivite MTT testi, Apoptoz testi, Komet testi, MDA seviyesi ve antioksidan enzim aktiviteleri ELISA testleri uygulanarak antikanser etkisi ortaya konulmuştur. Yapılan biyolojik testlerin değerlendirmelerine göre *R. melanophthalma* ve *R. chrysoleuca* likenlerinin ekstraktlarının artışıyla birlikte hücrelerin canlı kalma kapasitesi azalmıştır. Apoptoz ve nekroz tespiti için uygulanan liken ekstraktlarının kanserli hücreler üzerinde öldürücü etkisi tespit edilmiştir. Komet testi ile artan doza bağlı olarak DNA hasarı istatistiksel verilerle beraber belirlenmiştir. Antioksidan ELISA testleri sonucunda enzimatik aktivitenin azaldığı ve MDA miktarında artış olduğu ortaya koyulmuştur. Yapılan bu çalışmanın sonunda *R. melanophthalma* ve *R. chrysoleuca* likenlerinin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında kansere karşı koruyucu etkisi *in-vitro* koşullarda tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçları göstermiştir ki, likenlerin antikanser çalışmalarında kullanılması, sekonder metabolitlerinin belirlenmesi ve biyolojik aktivitelerinin ortaya konulması insan sağlığı açısından çok büyük katkılar sağlayacaktır.

2024, xiii + 47 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz Testi, MTT Testi, Meme Kanseri, *Rhizoplaca melanophthalma*, *Rhizoplaca chrysoleuca*.

# ABSTRACT

## MASTER THESIS

### DETERMINATION OF THE ANTICANCER PROPERTIES OF *RHIZOPLACA MELANOPHTHALMA* AND *RHIZOPLACA CHRYSOLEUCA* LICHEN EXTRACTS

ALEYNA BOZKURT

YOZGAT BOZOK UNIVERSITY  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES  
BIOLOGY DEPARTMENT

Assoc. Prof. Dr. Mustafa KOCAKAYA

Lichens are symbiotic organisms consisting of fungi and photosynthetic algae. The inhibition of cancer cells by the extract solution obtained from *Rhizoplaca melanophthalma* and *Rhizoplaca chrysoleuca* lichens was determined by MTT test and the LC<sub>50</sub> value of *R. melanophthalma* lichen was 92 µg/mL and the LC<sub>50</sub> value of *R. chrysoleuca* lichen was 46 µg/mL. The aim of this study was to determine the different biological activities of *R. melanophthalma* and *R. chrysoleuca* extract doses (23-182 µg/ml) on mammalian cell culture MDA-MB-231. In this study, the biological activity of lichen treatment groups on breast cancer cell line MDA-MB-231 cells was determined by MTT test, Apoptosis test, Comet test, MDA level and antioxidant enzyme activities ELISA tests. According to the evaluations of the biological tests, the survival capacity of the cells decreased with the increase of the extracts of *R. melanophthalma* and *R. chrysoleuca* lichens. Lichen extracts applied for the detection of apoptosis and necrosis had a lethal effect on cancerous cells. DNA damage was determined by Comet test with statistical data depending on the increasing dose. Antioxidant ELISA tests revealed a decrease in enzymatic activity and an increase in the amount of MDA. At the end of this study, the protective effect of *R. melanophthalma* and *R. chrysoleuca* lichens against cancer in MDA-MB-231 human breast cancer cell line was determined under *in-vitro* conditions. The results of this study showed that the use of lichens in anticancer studies, determination of their secondary metabolites and demonstration of their biological activities will make great contributions to human health.

2024, xiii + 47 Pages

**KEYWORDS:** Apoptosis Test, MTT Test, Breast Cancer, *Rhizoplaca melanophthalma*, *Rhizoplaca chrysoleuca*.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BEYANI.....	iii
ÖN SÖZ.....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser .....	3
2.2. Kanser Türleri .....	5
2.3. Meme Kanseri.....	6
2.3.1. Meme Kanserinde Epidemiyoloji.....	6
2.3.2. Meme Kanseri Etiyolojisi.....	6
2.3.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması .....	7
2.3.3.1. MDA-MB-231 .....	7
2.4. Likenler.....	8
2.4.1. <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> Türünün Genel Özellikleri .....	9
2.4.2. <i>Rhizoplaca melanophthalma</i> Türünün Genel Özellikleri.....	10
2.5. Komet Testi .....	11
2.5.1. Komet Testi Genel Aşamaları.....	12
2.6. Malondialdehit (MDA) .....	12
2.7. Antioksidan Savunma Sistemi .....	13

2.7.1. Hücre İçi Antioksidan Savunma Sistemleri .....	13
2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) .....	13
2.7.1.2. Katalaz (CAT).....	14
2.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	14
2.7.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malaonaldehit .....	14
2.7.2.1. Lipid Peroksidasyonun Toksisitesi .....	15
2.8. Hücre Ölüm Mekanizmaları .....	15
2.8.1. Apoptoz .....	15
2.8.2. Nekroz .....	16
2.8.3. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar .....	16
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. Likenin Ekstrakte Edilmesi .....	18
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 .....	19
3.4.2.3. MDA-MB-231 Hücre Hattının Pasajlanması .....	19
3.4.2.4. MDA-MB-231 Hücre Hattının Muhafaza Edilmesi.....	20
3.4.2.5. Hücre Sayımı .....	20
3.4.2.6. MTT Yöntemi .....	21
3.4.2.6.1. MTT Yöntemi ile MDA-MB-231 Hücreleri Üzerinde <i>Rhizoplaca melanophthalma</i> ve <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> likenlerinde LC <sub>50</sub> Belirlenmesi .....	21
3.4.3. DNA Hasarının Tespit Edilmesi.....	22

3.4.3.1. Komet Testi Yöntemi.....	22
3.4.4. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi.....	22
3.4.5. SOD, CAT ve GPx Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	23
3.4.6. Akridin Oranj/Etidyum Bromid (AO/EB) çift boyama.....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	25
4.1. MTT Testi Sonuçları.....	25
4.2. Komet Testi Analiz Sonuçları.....	25
4.3. MDA Seviyesinin Değerlendirilmesi.....	27
4.4. SOD Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	28
4.5. CAT Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	28
4.6. GPx Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	29
4.7. Akridin oranj- etidyum bromür boyası ile Apoptoz Saptanması.....	30
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	31
6. KAYNAKLAR.....	37

## TABLULAR LİSTESİ

### Tablo

### Sayfa

<b>Tablo 4.1.</b> MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında DNA hasarının ( $\pm$ SD) % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin ortalama değerleri.....	27
---	----



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	MDA-MB-231 hücreleri mikroskop görüntüsü.....	8
Şekil 2.2.	<i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> türünün genel görünümü .....	10
Şekil 2.3.	<i>Rhizoplaca melanophthalma</i> türünün genel görünümü.....	10
Şekil 4.1.	<i>R. chrysoleuca</i> ve <i>R. melanophthalma</i> 'nın MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	25
Şekil 4.2.	MDA-MB-231 hücrelerinin liken uygulama grupları ve floresan mikroskop ile çekilen fotoğrafları .....	26
Şekil 4.3.	<i>R. chrysoleuca</i> ve <i>R. melanophthalma</i> likenleri kontrol ve etkin doz gruplarının MDA seviyeleri.....	27
Şekil 4.4.	<i>R. chrysoleuca</i> ve <i>R. melanophthalma</i> likenleri kontrol ve etkin doz gruplarının SOD enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	28
Şekil 4.5.	<i>R. chrysoleuca</i> ve <i>R. melanophthalma</i> kontrol ve etkin doz gruplarının CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması .....	29
Şekil 4.6.	<i>R. chrysoleuca</i> ve <i>R. melanophthalma</i> kontrol ve etkin doz gruplarının GPx enzim aktivitelerinin karşılaştırılması .....	29
Şekil 4.7.	MDA-MB-231 hücrelerinin liken uygulama grupları ve floresan mikroskop ile çekilen fotoğrafları .....	30

## SİMGELER ve KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>cm<sup>2</sup></b>	: Santimetrekare
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile Su
<b>gr</b>	: Gram
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Su
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>L</b>	: Litre
<b>LC<sub>50</sub></b>	: %50 Öldürücü Doz
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>m<sup>2</sup></b>	: Metrekare
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>°C</b>	: Derece Santigrat

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>ATCC</b>	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
<b>CAT</b>	: Katalaz

<b>DMEM</b>	: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>HER2</b>	: Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>ER</b>	: Östrojen Reseptörü
<b>EtBr</b>	: Etiliyum Bromür
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>LMA</b>	: Düşük Erime Noktalı Agaroz
<b>LPO</b>	: Lipit Peroksidasyonu
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MDA-MB-231</b>	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
<b>MKC</b>	: Meme Koruyucu Cerrahi
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid
<b>NMA</b>	: Yüksek Erime Noktalı Agaroz
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponu
<b>PR</b>	: Progesteron Reseptörü
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz

# 1. GİRİŞ

Günümüzde kronik hastalıklar, kişilerin günlük aktivitelerinin kapasitesini azaltan ve fenotip olarak gözle görülen değişimlere yol açan, yaşam boyu süren veya uzun süreli tedavi gerektiren fakat tam anlamıyla iyileşmeyen hastalıklardır (Bayramova & Karadakovan, 2003; Sav vd., 2015). Bu kronik hastalıklardan biri olan kanser normal olmayan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde çok fazla görülmektedir ve birçoğu ölüm ile sonuçlanmaktadır. Bu sebeple dünyada en önemli sağlık sorunları içerisinde yer almaktadır (Parkin, 2006).

Dünya'nın her yerinde, bilim insanları vücudun kansere olan bağışıklığını güçlendirmek için bitkisel ilaçlar üzerine çalışmaktadır. Antikanser; bu bitkilerin farklı birçok bileşenlerinin etkisini çözerek kanserli hücrelere, vücudun sağlıklı hücrelerine zarar vermeyecek şekilde tasarlanabilmektedir (Eröz vd., 2012).

Likenler mavi-yeşil alglerin, siyanobakterilerin ve mantarların ortak yaşamlarını hemen hemen 20.000 tür ile ifade eden önemli örneklerdir (John, Güvenç & Türk, 2017). Likenlerin bu yaşam ortaklıklarından mantar ile olan ortaklığı için 'mikobiyont' olarak bahsedilirken, simbiyotik ortaklığından 'simbiyont' ve fotosentez yapan için 'fotobiyont' olarak bahsedilir (Sevgi & Tecimen, 2012). Likenler; yeryüzünde birçok ekosistemde (ağaç, toprak, kayaç vb.) gelişen canlılardır ve geniş coğrafi dağılımları söz konusudur. Bu özellik bakımından sağladığı avantaj ise; yavaş büyüyen ve çok yıllık olan likenler, her mevsim farklı olan diğer çiçek türlerine nazaran tek morfoloji gösterirler (Oksanen, 2006).

Avrupa ülkeleri başta olmak üzere pek çok ülkede doğal bitkisel ekstraktlar ile kanser hücrelerine karşı çalışmalar oldukça yoğun olarak yer almaktadır. Ancak son on yılda özellikle likenlerden elde edilen sekonder metabolitleri ile kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar ilaç adayları olarak umut olmaktadır (Ziech vd., 2012).

Bu tezin amacı *Rhizoplaca melanophthalma* ve *Rhizoplaca chrysoleuca* liken ekstraktlarının *in vitro* koşullarda MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında antikanser olarak koruyucu özelliklerinin tespit edilmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Kanser günümüzde en önemli kronik hastalıkların başında gelmektedir. Batı toplumlarına bakıldığında üç kişiden birinde kanser görülürken insanların beşte biri ise bu hastalığa bağlı olarak ölmektedir. Kanserinin %10-15'i genetik olarak aktarılırken geri kalan %85-90'lık kısmı ise insanın canlı hücrelerinin DNA'sının hayatı boyunca maruz kaldığı çeşitli kanserojenlere ve hücre bölünmesi sırasında oluşan hatalı DNA kopyalanmasına bağlı olarak şekillenmektedir (Williams, 2001). Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık olarak 14 milyon kanserli insan olduğu ve her yıl bu hasta sayısının yaklaşık olarak 1,6 milyon seyrettiği bilinmektedir. Yeni hastaların %53'ünün de 65 yaş üstü olduğu belirtilmiştir (Levit vd., 2013). Türkiye'de bu hastalığın görülme sırası, 10 ülke arasından 7'dir. 2018 yılında Türkiye'de insan nüfusu 81.916.866 iken, kansere bağlı yeni vaka sayısı 210.537'dir ve bu hastalıktan ölen insan sayısı 116.710 olarak bilinmektedir. 2020 yılında Türkiye nüfusunun 84.339.067 olarak artış göstermesiyle beraber yeni kanser vakalarının sayısı ise 233,834 olarak kaydedilmiştir. Kansere bağlı yaşamını yitiren insan sayısı ise 2020 yılında 126.335 olarak kayıtlara geçmektedir. Bu verilere göre 2018 yılına kıyasla 2020 yılında yarı oranda artış görülmektedir. (Akeren & Hintistan, 2021).

Kanserin tedavileri arasında hormon tedavileri, kemik iliği nakli, kök hücre tedavisi ve ameliyat gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi; kanserli hücrelerin kontrolsüz büyümesini, kimyasal ve biyolojik ajanlar yardımıyla engellemeyi amaçlamaktadır. Tedavi sırasında kullanılan ilaçlar kötü huylu hücrelerin yanında normal hücrelere de zarar vermektedir. Günümüzde sentetik ilaçların yan etkilerinin artması nedeniyle doğal olan ürünlere önem artmış bununla birlikte likenlerde dahil olmak üzere birçok organizmanın incelenip, bu canlılar üzerinde ileri araştırmaların yapılması sağlanmıştır (Cleeland, 2007; Baykara, 2016). Mantarlardan, bitkisel yapılardan ve çeşitli organizmalardan elde edilen ekstraktlarda yer alan metabolitler sayesinde birçok tedavi edici yöntemler bulunmuştur. Fotobiyont kısmını alglerin, mikobiyont kısmını da mantarların oluşturduğu simbiyotik organizma olan likenler, kendilerine has olan özellikleriyle metabolitleri üreten canlılardır (Müller, 2001). Bu metabolitler ile antikanser üzerine literatürde birçok çalışma yer almaktadır ve sekonder metabolitlerin apoptotik hücre ölümü, telomeraz aktivitesinin engellenmesi ve aerobik glikolizasyonun inhibisyonu gibi çalışmalar yapılmıştır. Likenlerden elde edilen ve üzerinde en çok çalışma yapılan sekonder metabolit ise usnik asittir. *Usnea*, *Rhizoplaca*, *Cladonia* türlerinde diğer türlere nazaran daha yaygın olarak görülmektedir. *Rhizoplaca* türlerinde usnik asit oranına bakıldığında %4'lük bir

rakamla karşılaşılmaktadır (Cansaran vd., 2006). Asya ve Avrupa ülkelerinde bu maddenin aynı zamanda medikal alanlarda ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bundan kaynaklı; antiviral, antibakteriyal ve analjezik etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Ingolfsdottir, 2002; Odabaşoğlu vd., 2006).

## **2.1. Kanser**

Kanserin insan sağlığını ciddi derecede etkileyen hastalık olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Geçmişten günümüze bu hastalıkla alakalı birçok değişim olmuştur. 1900 ve 1920'li yıllarda kansere karşı farklı bir yaklaşım benimsenmiştir. Bu yaklaşıma göre hasta yakınlarına kanser teşhisi konduğu söylenmekte fakat hasta olan insanlara bu durum söylenmemektedir. 1940'lı yılların başında, ilaçlar ile tedavi yöntemleri araştırılmaya başlamasıyla kanser ölüm demektir yaklaşımı kabul edilmiştir (Samur vd., 2000).

Canlıların temel yapı taşı hücrelerdir. Hücreler, hormon ve enzimler gibi uyarıcılar aracılığıyla canlının temel ihtiyacına göre düzenli şekilde gelişir, büyür, bölünür, yaşlanır ve ölür. Kanser, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle vücudun herhangi bir yerinde DNA hücrelerinin hasar alması sonucu oluşan anormal bir hızda büyümesi ve çoğalması ile oluşan hastalıkların genel bir adıdır (Vermeulen vd., 2003). Bu çoğalan hücrelerin kan veya lenf dışında ilk oluşum sağlanan yerden farklı olarak başka yerlere sıçramasına metastaz denir. Kanser hücreleri, tümörden belirli bir sebepten dolayı ayrılırsa kan ve lenf dolaşımı sayesinde diğer yerlere geçiş yapabilmektedir. Buldukları bölgede yeniden koloni şeklinde tümör oluşturup kontrolsüzce büyümeye devam ederler. Bu hücrelerin sağlıklı hücrelerden farkı ise apoptoza uğramamaları ve birbirlerine yapışık olmamasıdır. Hücreler kansere neden olan bu etkenler ile karşı karşıya kaldıklarında tümörleri oluşturur ve mutasyonları meydana getirir. Bağışıklık sistemi ise normalde kanserleşmiş hücreleri yakalayıp yok edebilme yeteneğine sahiptir ancak kanser hücreleri bağışıklık sisteminden kaçmaktadır. İyi huylu kanser çok nadir yayılma gösterirken, kötü huylu kanserde hücreler büyüyerek yayılma göstermektedir (Topal vd., 2009; Öncel, 2012; Barbaros & Dikmen, 2015).

DNA dizisindeki değişiklikten kaynaklanmayan gen fonksiyonlarını inceleyen bilim dalına epigenetik denir. Kanserlerin ortaya çıkma sebebi genellikle DNA dizisindeki anormallikten oluşur. DNA üzerinde meydana gelen bu somatik mutasyonlar, bir genin işlevini değiştirerek hücreye büyüme olanağı sağlamaktadır (Feinberg vd., 2006). Sağlıklı hücreler genelde büyümek için sinyallere ihtiyaç duyarlar. Moleküler kaskad olarak bilinen yöntem ile

sinyallerin bir hücreden diğerine iletilmesi gerçekleştirilir. Kanser hücrelerinde bulunan onkogenler çoğalmayı sağlar ve büyüme sinyali olarak işlev görmektedir. Onkogenlerdeki mutasyonlar, sırasıyla bir genin normal işlevinin bozulmasına veya artmasına yol açar. Bu tür genlerin anormal bir şekilde etkinleştirilmesinin kanserin başlangıcıyla ilişkilendirilebileceği öne sürülmüştür. Araştırmalar, epigenetik değişikliklerin genetik değişiklikleri tetikleyebileceğini ve bu değişikliklerin tümörün ilerlemesine ve başlamasına etki edebileceği hipotezini desteklemektedir (Feinberg vd., 2006; Witsch vd., 2010).

Bir onkogen etkisi sonucu, hücre çoğalmasına benzer kritik bir durum algılandığında hücre ölümünü başlatan apoptozis yolu devreye girer. Bu, organizmanın sağlıklı hücre sayısını kontrol etmek için önemli bir mekanizmadır (Evan & Littlewood, 1998). Genellikle bu süreç mitokondri tarafından sitokrom C'nin pro-apoptotik sinyallere karşılık olarak salgılanmasıyla başlamaktadır. P53 gibi tümör baskılayıcı proteinler, apoptozis yolunu etkileyen önemli proteinlerdir. Bu proteinler, hücrenin ölümünü hızlandırarak, hücrelerin pro-apoptotik olarak adlandırılan ölüm genlerinin daha fazla üremelerini teşvik eder. Bu nedenle, hücreler daha fazla apoptozis yoluyla ölme eğilimindedir ve bu anormal hücre çoğalmasını kontrol etmeye yardımcı olabilir ve sonuç olarak hücre kanser ile mücadele edebilmektedir (Green & Reed, 1998).

Hücre siklusu dinlenme ve bölünme olarak iki evreden oluşmaktadır. Dinlenme dönemi G0 fazı olarak adlandırılır ve yaşamsal olayların devam ettiği dönemdir. Bölünme döneminde mitoz bölünmeye hazırlık yapılmaktadır. G1, S ve G2 olmak üzere üçe ayrılır. G1 fazı en uzun faz olup DNA replikasyonu için gerekli olan protein üretimi ve RNA üretiminin olduğu evredir. S fazında DNA replikasyonu için gerekli bölgeler işaretlenir ve DNA diploid hal alır. G2 fazı hazırlık evresidir, transkripsiyon ve translasyon tekrar hazırlanmaktadır. Hücrenin iki eş haline geldiği mitoz bölünme aşaması ise M fazıdır (Moses, vd., 1990; Foley & Eisenman, 1999). DNA tamir genlerindeki mutasyonlar, hücrelerin kontrolsüz bölünmeye devam etmelerine yol açabilir. Bu tür mutasyonlar, hücrelerin DNA hasarını düzeltme yeteneklerini kaybetmelerine neden olur. Sonuç olarak, bu hücrelerde genetik hatalar birikir ve bu hatalar kanser gelişimine katkıda bulunur. Öte yandan, DNA tamir genlerindeki mutasyonlar aynı zamanda onkojenik fonksiyonlarının ortaya çıkmasına da yol açabilir. Bu nedenle, DNA tamir genlerindeki mutasyonlar kanser gelişimine katkıda bulunan iki yönlü etkiye sahip olabilir. Bir yandan tümör baskılayıcı işlevler kaybedilirken diğer yandan onkojenik özelliklerin açığa çıkmasına neden olabilmektedir (Flatt & Pietsenpol, 2000; Cheng vd., 1998).

## 2.2. Kanser Türleri

Farklı isimlere göre birçok kanser türü bulunmaktadır. Bu türler akciğer kanseri, prostat kanseri, safra kesesi kanseri gibi hücre tipi ve buldukları organa göre şekillenmektedir (Babaç vd., 2023). Meme kanseri, bu türler arasında akciğer kanserinden sonra görülen en yaygın ikinci kanser türleri arasında yer almaktadır (Kozan & Tokgöz, 2016).

- 1.Karaciğer Kanseri
- 2.Safra Kesesi Kanseri
- 3.Akciğer Kanseri
- 4.Baş ve Boyun Kanserleri
- 5.Kolorektal Kanserler
- 6.Pankreas Kanseri
- 7.Üriner Sistem Kanserleri
  - a. Mesane Kanseri
  - b. Böbrek Kanseri
8. Özefagus ve Mide Kanseri
9. Endokrin Bezleri Kanseri
10. Cilt Kanserleri
- 11.Meme Kanserleri
- 12.Kemik Kanserleri
- 13.Jinekolojik Kanserler
- 14.Erkek Genetik Organ Kanserleri
- 15.Merkezi Sinir Sistemi Kanserleri
- 16.Multiple Myeloma
- 17.Lenfomalar
  - a. Non-Hodgkin Lenfoma
  - b. Hodgkin Lenfoma
- 18.Lösemiler

- a. Akut Lenfoblastik Lösemi
- b. Akut Myeloblastik Lösemi
- c. Kronik Lenfositik Lösemi
- d. Kronik Myelositik Lösemi

## **2.3. Meme Kanseri**

### **2.3.1. Meme Kanserinde Epidemiyoloji**

Meme kanseri dünya üzerinde 4,4 milyondan fazla kadında görülmekte olup tüm kanserlerin yaklaşık olarak %31'ini oluşturmaktadır (Smigal vd., 2006). 2005 yılında Boyle ve Ferlay tarafından yapılan araştırmaya göre, gelişmiş ülkelerde 636,128 meme kanseri vakası tespit edilmiş ve bunların 189,765'i maalesef ölümle sonuçlanmıştır. Ayrıca aynı dönemde gelişmekte olan ülkelerde 514,072 meme kanseri vakası rapor edilmiş ve bu vakaların 220.648'i ölümle sonuçlanmıştır. Sonuç olarak bu araştırma, 1950 yılından günümüze kadar olan süreçte meme kanseri insidansının her yıl %2'lik bir oranda arttığını göstermektedir. Bu araştırmada, Avrupa ülkelerinde en sık karşılaşılan kanser türlerinin içinde meme kanserinin %13'lük oranıyla üçüncü sırada yer aldığı tespit edilmiştir (Boyle & Ferlay, 2005).

Meme kanseri görülme riskleri arasında yaş faktörü de bulunmaktadır. 30-34 yaş arası %0,25 ve 45-49 yaş kadınlarda %0,2 olarak saptanmıştır. 40-50 yaş aralığında artış görülmekle birlikte 50'den sonra menopoz dönemine geçiş bulunduğundan düşüş görülmektedir (Key vd., 2001; Winters vd., 2017).

### **2.3.2. Meme Kanseri Etiyolojisi**

Meme kanseri etiyojisi, bir dizi farklı faktöre bağlı olarak değişebilir. Bazı faktörler, genetik gibi meme kanseri riskini etkileyen ve değiştirilemeyen faktörler arasında yer alırken; beslenme, fiziksel aktivite, davranış gibi çevresel ve kişisel faktörler ise değiştirilebilir risk faktörleri olarak kabul edilir. Meme kanseri riskini belirleyen temel faktörler; yaş, coğrafi konum, yumurtalık aktivitesinin spesifik göstergeleri, iyi huylu meme hastalığı öyküsü ve aile geçmişinde meme kanseri bulunup bulunmaması detaylarını içerir. Düşük seviyelerdeki androjen metabolitlerinin vücuttan atılmasının meme kanseri riskini büyütmektedir (MacMahon vd., 1973).

### 2.3.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

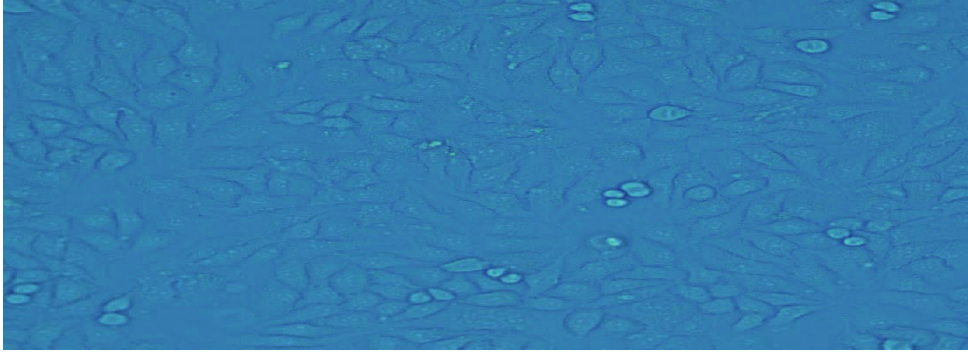
Meme kanserini moleküler olarak dört alt tip şeklinde sınıflandırabiliriz. Bunlar; Luminal A, Luminal B, HER2 ve bazal tip olmak üzere adlandırılır. Hormon reseptörleri kanserin östrojen ile progesteron varlığını veya yokluğunu, kanser hücrelerinin ise bu hormonlara karşı duyarlı olup olmadığını göstermektedir. Estrogen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olurken HER2 reseptörü negatif ekspresyon kanserleridir. Bu üç tip en yaygın görülen alt tiplerdir (Howlader vd., 2014).

Luminal A en yaygın alt tiptir. Luminal A tümörleri Luminal B kanserine göre östrojen reseptörü (ER) ile ilişkili genler arasında daha düşük düzeyde ifade edilirken, hücrel çoğalma ile ilgili genler arasında daha az aktif olduğu tümörlerdir. Luminal B tümörleri Luminal A tümörlerine göre daha kötü bir prognoza sahiptir. Bu tümörlerin seyri hastalığın ilerlemesi ve tedaviye verilen yanıt açısından olumsuz eğilim göstermektedir. Luminal A endokrin tedavisine olumlu yanıt verirken, Luminal B kemoterapi ve hormonal tedavinin beraber yürütülmesinden yararlanılmaktadır. HER2 aşırı ekspresyonlu meme tümörleri, kötü bir prognoza sahiptir ve kemoterapiye daha iyi patolojik yanıt oranları verme eğilimindedir. Son olarak Bazal tip (üçlü negatif) ise ER-PR-HER2- tümörlerden oluşmaktadır. Diğer alt tiplere nazaran daha erken hasta yaşı ile ilişkilidir. ER-PR-HER2 negatif olan meme kanserleri hormon reseptörleri ve HER2 tarafından etkilenmeyen tümörlerdir (Dai vd., 2015). Meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı hücre hatları kullanılabilir. Kullanılan bu hücre hatlarının her birinin özellikleri birbirinden ayırım göstermektedir ve mekanistik çalışmalarda genellikle tercih edilmektedir. Örneğin T47D ve BT474 hücre hatları, invaziv duktal karsinom olarak adlandırılan ve luminal alt tipi olarak sınıflandırılan meme kanserlerinin hücre hatlarıdır. Metastatik adenokarsinom alt tipinde yer alan bazal hücre hatları MDA-MB-231 ve MDA-MB-468'dir ve bu hücre hatları ER-negatif (ER-) hücre hatlarıdır. T47D ve MCF-7 hücre hatları ise ER-pozitif (ER+) hücre hatları olarak kategorize edilmiştir (Driessens vd., 2009; Li vd., 2017).

#### 2.3.3.1. MDA-MB-231

MDA-MB-231 hücre hattı, ilk olarak 17 Ekim 1973 tarihinde M. D. Anderson Kanseri Merkezi'nde, metastatik meme kanserli bir hastanın plevral efüzyonundan alınan örneklerde incelenmiştir. Bu nedenle MDA-MB-231 hücre hattı metastatik bir hücre hattıdır. Bu hücre hattının yapışma yeteneği olduğundan *in-vitro* kültür çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilir (Cailleau vd., 1974). MDA-MB-231 hücre dizisi TNBC (Triple-Negative Breast Cancer) tipi

olup meme kanserinin üç belirleyici reseptörleri olan ER, PR ve HER2 ile negatif olduğunu belirtmektedir. Bu tip meme kanseri kısaca ER, PR ve HER2 reseptörlerine ait olmayan ve ifadelerini göstermeyen kanser alt tipidir. Bu tip meme kanserinde ise erken teşhis ve tedavi önemli rol oynamaktadır (Kenny vd., 2007) (Şekil 2.1).



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

#### **2.4. Likenler**

Likenler tek başına birer organizma değildir. Mantarlar ve fotosentetik alglerden meydana gelen simbiyotik birlikteliklerdir. Başka bir deyişle alg ve mantarların bir araya gelerek oluşturduğu morfolojik ve fizyolojik birliklerdir. Likenler kendilerini meydana getiren alg ve mantarlardan morfolojik olarak farklı yapıya sahiptir. Mantar ve alg bileşenleri ayırt edilebilir. Bu biyolojik yapının %90'lık kısmını fungal oluşturmaktadır. Likenlerin bileşenlerinden olan mantarlar genelde Ascomycetes sınıfına ait heterotrof organizmalardır ve nadiren Basidiomycetes sınıfına dahil olan organizmalar da bulunabilirler. Ayrıca alg türlerinin çoğu, mantar kısmı (mikobiyont) olmadan da gelişimini devam ettirebilmektedir. Likenlerin yapısındaki diğer organizma olan algler ise genellikle Chlorophyceae (yeşil algler), nadiren Cyanophyceae (mavi-yeşil algler) sınıfına giren ototrof organizmalardır (Tyler, 1989).

Likenler morfolojik yapılarına göre üç sınıfa ayrılmaktadır. Kabuksu, yapraksı ve dalsı şeklinde sınıflandırılmaktadır. Üzerinde yaşadıkları substratlara göre; epigeik (döküntüler ve ölü yosun tabakaları üzerinde yaşayan likenler), epifitik (ağaç gövde ve dalları üzerinde yaşayan likenler) ve epilitik (kaya ve taşlar üzerinde yaşayan likenler) olarak üç gruba ayırmaktadır. Zengin çeşitliliği açısından yüksek dağlardan kıyı kesimlerinde, kayaların üzerinde, çöllerde, kutuplardan tropikal bölgelere dağılım göstermektedir ve farklı iklim koşullarında yaşayabilmektedir (Sloof, 1993). Geçmişte likenler birçok farklı amaçlar için kullanılmıştır. Hastalıkların araştırılmasında kullanılan bazı liken türleri mevcuttur. Örneğin

*Lobaria pulmonaria* L. (Akciğer likeni), yapısı akciğere benzediğinden solunum yolu hastalıkları üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Sarılık hastalığını tedavisinde renginden tanınan *Xanthoria parietina* L. kullanılmıştır. Ayrıca likenlerin sahip olduğu doğal antioksidan aktivitesi, onların besin şeklinde tüketilmesi halinde yaşam süresini uzatma ve antimutajenik etkileri de bilinmektedir (Altun, 2007).

Birçok farklı ülke olmak üzere özellikle Avrupa'da kanser hastalığıyla mücadele için doğada bulunan şifalı yapıların ekstrelerinin hastalık üzerine etkilerini inceleyen çok fazla çalışmalar yapılmaktadır. Dünya geneline bakıldığında organizmalardan elde edilen bileşenlerin kanser hücrelerine karşı potansiyel etkilerini araştıran çalışmalar yoğun olarak yürütülmektedir. Kanser hücrelerine karşı likenlerin sitotoksik etkisi hücre döngüsünü G2/M, S veya G0/G1 fazlarında durdurma etkisiyle ilişkilendirilmiştir. Bu etki; apoptoz, nekroz ve otofaji sayesinde kanserli hücrelerin zarar görmesini sağlamaktadır (Yurdacan vd., 2019).

Farklı liken türlerinde bulunan sekonder metabolitlerin çeşitli kanser hücre hattı üzerinde test edilip bu metabolitlerin etki ettiği mekanizmaları araştırarak, antikanser etkili bileşikler için bir yeni keşif yöntemi olabilir. Bu metabolitler; kanser hücreleri üzerindeki mekanizmaları anlamaya ve antikanser etkilerini görmeye yardımcı olmaktadır. Ayrıca bir dizi hastalığın gelişimine karşı da koruyucu etken olacağını gösteren *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda bu fotobiyont ve mikobiyont özellikli organizmalardan elde edilen metabolitlerin sadece kansere karşı değil diğer hastalıkların gelişimine karşı koruyucu ve tedavi edici etkilere sahip olabileceğini ortaya koymaktadır (Singh vd., 2013).

#### **2.4.1. *Rhizoplaca chrysoleuca* Türünün Genel Özellikleri**

Tallus sarımsı veya beyazımsı şekilde ve genellikle parlak yeşil görünümündedir. Korteks sarı renkli ve üst kısım ise konvektir. Parafiz ise geniş değil ve renksizdir. Apotesyum boyu 1-4 mm arasında değişkenlik göstermekle birlikte diskler sarımsı renkten parlak turuncumsu kırmızıya kadar farklılık göstermektedir. Sporlar 8-12/3-6 mikrometre boyundadır. Yaşam alanı olarak, dağlık bölgelerde yerleşim sergilemektedir ve sıcak olmayan bölgeleri tercih etmektedir. Dağların zirvelerinde ve eteklerinde gelişimini sürdürmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *Rhizoplaca chrysoleuca* türünün genel görünümü

#### 2.4.2. *Rhizoplaca melanophthalma* Türünün Genel Özellikleri

Tallus *R. chrysoleuca*'ya oldukça benzemektedir ve genellikle 0,5-1,5 cm çapındadır. Yassı ve pul şeklinde görünmektedir. Apotesyum 1-3mm boyutlarında ve loblar bazen belirgin, bazen belirsiz olacak şekilde 0,5-5 mm uzunluğundadır. Kenarları düz ve aşağı dönük şekildedir, üst yüzey parlak ve mat görünümlüdür. Genelde açık yeşil, sarı renktedir ancak herbaryumda daha sarımsı veya açık kahverengimsi görünmektedir. Sporlar, 9-12 x 5-6 mikrometre boyutlarında olmaktadır (Şekil 2.3). Genelde soğuk ve dağlık bölgelerde bulunmaktadır ve dağların eteklerinde, zirvelerinde, kayaların üzerinde yaşamını sürdürmektedir (Leavitt vd., 2013).



Şekil 2.3. *Rhizoplaca melanophthalma* türünün genel görünümü

## 2.5. Komet Testi

Komet testi mayadan insan hücresine kadar bireysel ökaryotik hücrelerde nükleer DNA hasarını tespit etmek için kullanılan çok yönlü bir yöntemdir. Tespit edilen hasar türleri, DNA iplik kesikleri ve alkali-labile bölgeleri, alkile edilmiş ve oksitlenmiş nükleobazları, DNA-DNA çapraz bağlarını, UV ışığından kaynaklanan sirklobütan pirimidin dimerlerini ve bazı kimyasal nedenli DNA eklentilerini içerir. Bu yöntem DNA hasarının değerlendirilmesi için kullanılan en popüler yöntemler arasında yer almaktadır (Gichner vd., 2000; Söylemez vd., 2012).

Örnek türüne bağlı olarak, örneklerin işlenmesi sırasında ek DNA hasarının oluşmasını önlemek ve örnek grupları arasındaki hasar seviyelerini tespit etmek amacıyla yeterli duyarlılığı sağlamak için komet analizi protokolünde önemli değişiklikler yapılması gerekebilmektedir. Komet testinin çeşitli uygulamaları akademi, endüstri ve düzenleyici kurumlardaki araştırma grupları tarafından doğrulanmıştır ve OECD tarafından hayvan organlarında genotoksisite için *in-vivo* bir test olarak kabul edilmesiyle güçlü yönleri vurgulanmıştır. Komet testi çeşitli hücre tipleri, türler ve DNA hasarı türleri için kullanılabilir çok yönlü bir testtir. Komet testi, profesyonel veya çevresel mutajenlere maruz kalmanın etkilerini incelemek, farklı hastalıklara ilişkin DNA hasarını ölçmek, yaşam tarzı, beslenme ve diyet takviyelerinin insan hücrelerinin taze veya dondurulmuş örneklerinde genetik stabilite etkisini ölçmek ve kontrol etmek için uygun olan hızlı, basit ve hassas bir testtir (Brendler-Schwaab vd., 2005; Collins, 2004).

Oluşan DNA hasarı veya yetersiz onarım mekanizmaları, kanser ve diğer bulaşıcı olmayan hastalıkların kökeninde önemli bir rol oynadığı bilinen bir faktördür. Bu sebeple komet testi teorik olarak ileride yaşanması ihtimal dahilinde olan hastalık riskini gösterebilen erken genetik hasarları tespit etmek amacıyla kullanılabilir (Mañas vd., 2009).

Komet testinin diğer genotoksisite testlerine göre avantajları arasında düşük DNA hasarı seviyelerini tespit etme konusundaki yüksek hassasiyeti, numune başına az sayıda hücre gereksinimi, esnekliği, basitliği, uygulama kolaylığı, ekonomik olması ve hızlı sonuçlar elde etme nitelikleri de bulunmaktadır (Koppen vd., 2017).

Ek olarak komet testinin biyo-izleme adına bir diğer faydası ise çoğalan ve çoğalmayan hücrelerde dahil olmak üzere geniş bir hücre cetveline, genotoksik hareketler eylemler için ilk rota olan doku hücrelerine uygulamasındaki yeterli fizibilitesidir (Gunasekarana vd., 2015).

Bu belirtilen özellik ve avantajlarından dolayı, komet testi moleküler çalışmalarda yoğunlukla DNA hasarı tespiti için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Mesleki ve çevresel faktör kaynaklı olan pestisitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ağır metaller veya iyonlaştırıcı radyasyon vb. tehlikeli ajanların süreç içerisinde etkilerinin gözlenmesi konusunda da önemli bir rol oynamaktadır (Dinçer & Kankaya, 2010; Tozan-Beceran vd., 2011).

### **2.5.1. Komet Testi Genel Aşamaları**

Komet testini yapabilmek adına öncelikle tek hücreli bir süspansiyon gerekmektedir. Bazen örnekler zaten bir süspansiyon halindedir fakat yapışkan hücreler, organizmalar veya bazı dokularda çalışırken belirli tamponlardan mekanik veya enzimatik işlemler ile muamele etmekte gerekmektedir.

Adım 1) Dondurulmuş veya taze örneklerin hazırlanması ve izolasyonu.

Adım 2) Standart komet testi için slaytların hazırlanması.

Adım 3) Hücre lizis aşaması.

Adım 4) DNA çözülümü ve Elektroforez.

Adım 5) Nötralizasyon İşlemi.

Adım 6) Boyama ve floresan mikroskop ile görüntü analizi (Dikilitaş & Koçyiğit, 2010; Fidan, 2005).

### **2.6. Malondialdehit (MDA)**

Malondialdehit (MDA), yağ asitlerinin serbest radikaller ile etkileşime girmesi sonucu oluşan peroksidasyon ürünüdür. Lipid peroksitler yıkıldığında ortaya çıkan sekonder bir ürün olmakla birlikte biyolojik açıdan aktif rol oynamaktadır. MDA oldukça reaktif bir bileşiktir, oksidatif stresin belirleyicisi olarak kullanılan biyoindikatördür çünkü lipidlerin oksidatif bozunmasının sonucu olarak oluşmaktadır. MDA miktarının tayini açısından lipid peroksit düzeylerinin bulunmasında kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonu, hücre zarındaki lipid yapısında olan değişiklikler sonucunda hücre zarının işlevini bozması, serbest radikallerin de enzimleri denatüre edici etkisi ve son ürün olarak ortaya çıkan aldehitlerin ise hücrede zarara yol açmasından kaynaklı hücre hasarına yol açmaktadır. MDA oluştukları bölgeden uzak bölgelere difüze olabilmektedir. Bu özellik açısından doku hasarına sebep olmaktadır (Gutteridge, 1995). MDA aynı zamanda DNA gibi biyomoleküllerle reaksiyona girebilmesi

sonucu oksidatif stresi tetiklemektedir. Bu durum artrit, kanser, karaciğer hastalıkları ile arasında bağlantı olduğunu işaret etmektedir (Aslankoç vd., 2019; Sanyal vd., 2009).

## **2.7. Antioksidan Savunma Sistemi**

İnsan vücudunda metabolik reaksiyonların bir yansıması olarak serbest radikal biçiminde reaktif türlerin çeşitli tipleri ortaya çıkar. Bu türler azot kökenli veya oksijen kökenli meydana gelebilmektedir. Bu türler literatürde prooksidanlar olarak isimlendirilmektedir. Bu reaktifler, DNA, protein, lipit vb. makro ölçekli moleküllere atak yaparak hücresel veya dokusal hasarlara yol açmaktadır. Oluşan bu hasarlara karşı mücadele etmek adına ise insan vücudunda antioksidanlar olarak adlandırılan bir grup bu görevi üstlenmektedir (Valko vd., 2007).

Antioksidanlar iki şekilde insan vücudunda var olmaktadır ya endojen olarak üretimi yapılır ya da ekzojen kaynaklarından alınmaktadır. Bu antioksidanlar içerik olarak süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleri, Se, Mn, Cu ve Zn gibi minerallerle birlikte A, C ve E vitaminlerini içermektedir. Sağlıklı bir insan bedeninde antioksidanlar ve prooksidanlar bir denge içerisinde yer almaktadır fakat prooksidanlar seviyesinde oluşabilecek herhangi bir artış oksidatif stresi meydana getirmektedir. Antioksidan savunma sistemi ise insan vücudundaki biyolojik düzeni oksidatif etkenlerden savunmak amacıyla gelişmiş evrimleşmiştir (Mccord, 1993; Kireççi, 2018).

### **2.7.1. Hücre İçi Antioksidan Savunma Sistemleri**

#### **2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)**

Süperoksit dismutazlar (SOD), süperoksit radikallerinin hidrojen ve oksijen peroksid dönüşümlerini düzenleyen içeriğinde metal bulunduran bir enzimdir. Süperoksitler oksijen mekanizmalarında yan ürün olarak açığa çıkmaktadır ve düzenlenmemeleri halinde hücre hasarına sebep olabilmektedirler (Borgstahl vd., 1996).

Yapılan incelemeler sonucunda bu enzimin tüm aerobik organizmalarda var olduğu keşfedilmiştir. Meydana gelen birçok toksik indirgenmiş oksijen türüne karşı savunma mekanizmalarında büyük rol oynar. Çevresel faktörler sebebiyle oluşumu artış gösterebilen oksijen radikallerinin organizmalarda oluşturduğu strese karşı tolerans göstermesi adına önemli olduğu öne sürülmüştür (Hayyan vd., 2016).

### **2.7.1.2. Katalaz (CAT)**

Oksijen ile ilişkisi bulunan neredeyse tüm canlılarda katalaz enzimi bulunmaktadır. Hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) su ve oksijene dönüştürerek işlev görmektedir. Reaktif oksijen türlerinin hücre ve doku içerisinde oluşturabilecekleri hücre hasarına karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. Katalaz enziminin döngü hızı ortalama enzimlerin döngü hızına göre daha yüksektir (Karabulut & Günay, 2016).

Tetramer yapıda olan katalaz 500-550 amino asitten fazla uzunluğa sahiptir. İnsan katalaz enziminin aktivitesi için optimum pH değeri 7'dir. Katalaz seviyelerini tespit etmek önemlidir çünkü kanser, oksidatif stres, diyabet vb. hastalıkların oluşumu konusunda ilişkisi bulunmaktadır (Goodsell, 2004; Ścibior & Czczot, 2006).

### **2.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)**

Glutasyon Peroksidaz (GPx) temel biyolojik görevi dokuyu, hücreyi veya organizmayı oluşabilecek oksidatif hasarlardan korumak olan bir diğer enzim ailesinden biridir. Bazen sitozolde ve bazen mitokondride hidrojen peroksidi suya dönüştüren organizma için önemli enzimlerden biridir (Muthukumar & Nachiappan, 2010).

Genellikle etkinliği selenyuma bağlıdır ve aktivitesi selenyuma bağlı ve bağlı olmayan olarak ikiye ayrılıp değerlendirilme şansı bulunmaktadır. Oksidatif strese karşı hücreyi savunmak bu enzimin en önemli rolüdür. Şu ana kadar tanımlanmış 8 adet GPx enzimi bilinmektedir (Sanyal vd., 2009).

### **2.7.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malaonaldehit**

Malondialdehit (MDA), hücre içerisindeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona uğraması sonucu oluşan son ürünlerdendir. Hücre içerisinde varlığını artıran serbest radikallerin sonucu olarak malondialdehit üretimi de artış göstermektedir. İki veya ikiden daha fazla karbon-karbon çift yapısına sahip olan yağ asitlerine çoklu doymamış yağ asitleri denir ve lipid peroksidasyon ise bu çoklu doymamış yağ asitlerinin bozulması olarak tanımlanmaktadır (Ceconi vd., 2003).

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller veya çoklu doymamış yağ asitlerindeki alfa metilen gruplarından H atomunun etkileşime girmesi sonucu gerçekleşmektedir. Hücre zarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin çift bağları hedef alınarak oksidasyon süreci başlamaktadır. Serbest radikaller ve hücre membranında yer alan kolesterol ve doymamış yağ asit bağları ile etkileşime girmesi sonucu lipid peroksidasyonu tetiklenmektedir. Kanserli hastalarda

antioksidan ve oksidatif stres durumlarının ölçümü amacıyla malondialdehit bir marker yani belirteç olarak kullanılmaktadır (Del Rio vd., 2005; Young & Woodside, 2001).

### **2.7.2.1. Lipid Peroksidasyonun Toksikitesi**

Membranda bulunan lipidlerin peroksidasyonu çift yapıda bulunan lipid katmanlarının fiziksel yapılarında dikkate alınmaya değer değişiklikler meydana getirdiği bilinmektedir. Ekseriyetle değişikliğe uğrayan yapılar olarak lipid-lipid etkileşimleri, membran geçirgenliği ve akıcılığı, iyon gradyanları örnek olarak belirtilmektedir (Cormerais vd., 2016).

Lipid peroksidasyon sonucu oluşan ürünlerin, kendiliğinden bozunmaya uğrayan hücre ürünlerinden çok daha ek toksisiteye sahip oldukları bilinmektedir. Lipid peroksidlerin aldehit bozunma ürünleri dokulara ve hücrelere toksiktir. Malonaldehit (MDA) ve 4-HNE hücre için oldukça yüksek reaktif maddelerdir. DNA primerlerindeki aminler ve proteinler MDA ile çapraz bağlı reaksiyon oluşturabilmektedirler. Lipid peroksidasyon nedeniyle oluşan bu kovalent modifikasyonlar, nükleik asit ve proteinlerin yapılarını değiştirerek oluşan toksik ortamın kaynağını oluşturmaktadır (Draper, 1990; Halliwell & Chirico, 1993).

## **2.8. Hücre Ölüm Mekanizmaları**

### **2.8.1. Apoptoz**

Apoptoz bir diğer adı programlanmış hücre ölümü fizyolojik bir süreçtir aynı zamanda apoptoz hücre intiharı olarak da bilinmektedir. Her saniye vücudumuzda yaklaşık bir milyon civarı hücre doğarken aynı zamanda bir milyon kadar hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bu süreç ömür boyu devam etmektedir. Ayrıca embriyonik gelişimde etki göstermektedir (Kerr vd., 1972).

Apoptozun yetişkin organizmalarda dengeleyici görevi, dokularda bulunan hücre sayısının kontrol altına alınmasını sağlamaktadır. Bu süreç; bir organizmanın hayatı boyunca hücreleri üretmesi, zarar görenleri ortadan kaldırması ve aynı zamanda onarım yapması için kritik rol oynamaktadır. Bir başka özelliği ise organizmanın homeostazını korumadaki rolüdür. Aşırı hücre çoğalmasını ve birikimini önlemektedir. Bu özelliklerle birlikte yararlı hücrelerin devamlılığı için yaşamasına yardımcı olurken, potansiyel tehlike oluşturan hücreleri de tespit edip programlanmış bir şekilde ölmesini sağlamaktadır (Grabacka vd., 2014). En önemli özelliklerinden biri ise hücre içindeki DNA'nın özgün olarak parçalanmasıdır. Bu parçalanma ile genetik materyalin düzenlenmesi açısından önemlidir. Mitokondriyal

fonksiyon kaybıyla ilişkili olan apoptozun mitokondri ile ortak önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (Zhou vd., 2001; Andón & Fadeel, 2013).

### **2.8.2. Nekroz**

Doku ölümü olarak bilinmektedir ve zarar gören hücrelerin veya dokuların geri döndürülemez şekilde patolojik olarak ölümü gerçekleşmektedir. Nekroza yol açan nedenler sırasıyla hipoksi, iskemi, hipertermi şiddetli oksidatif stres olarak sıralanmaktadır. Hücresel zararın ortaya çıkmasına arsenik, siyanid gibi zehirli maddeler ve ağır metaller neden olmaktadır. Bu toksik maddeler hücrelerin anormal şekilde ölümüne sebep olurken doku hasarına yol açmaktadır (Fink & Cookson, 2005).

### **2.8.3. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar**

Apoptoz ve nekroz arasında birçok fark görülmektedir. Morfolojik olarak baktığımızda; nekrozda hücre şişmesi, kromatin kümelenmesi, hücre lizisi, endoplazmik retikulum dilatasyonu görülürken, apoptozda hücre küçülmesi ve hücre membranı olmaktadır fakat membranda kabarcıkların oluşumu görülmektedir. Ayrıca kromatin hücre çekirdeğinin etrafında toplanmış ve yoğunlaşmış bir görünüm sergiler. Bu durumda organellerde parçalanma veya dağılma olmaz. Nekroz için ATP ihtiyacı yoktur fakat apoptozda ATP'ye ihtiyaç duyulur. Hücre ölümlerine baktığımızda; apoptozda tek tek ölüm gözlenirken, nekrozda gruplar halinde ölüm gerçekleşmektedir. Biyokimyasal özelliklerini karşılaştırdığımızda, nekrozda DNA rastgele parçalanmaktadır ve agaroz jel elektroforezinde smear görüntüsü elde edilmektedir. Apoptozda ise DNA internukleozomal alanlarda 180 kb olacak şekilde kırılmaktadır ve agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni karşımıza çıkmaktadır (Willingham, 1999). Apoptoza genelde kanser ilaçları, hücre yaşlanması, radyasyon, Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu, şiddetli olmayan oksidatif strese neden olmaktadır. Nekrozda ise şiddetli oksidatif strese, litik viral enfeksiyonu ve hipoksi sebep olmaktadır (Golstein & Kroemer, 2007).

Bu çalışmada, meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleriyle periyodik şekilde artan dozlarda *R. melanophthalma* ve *R. chrysoleuca* likenleri kullanılarak anti kanser özellikleri araştırılmıştır. Çalışmada MTT yöntemi ve Komet testi kullanılarak hücre proliferasyonu ile DNA hasarına bakılıp enzim aktiviteleri durumu ve MDA seviyesi değerlendirilerek çalışılan liken türlerinin biyolojik aktiviteleri ortaya koyulmuştur.

## 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

Agaroz

MTT kiti (Roche)

Ethidium Bromide

Trypsin-EDTA %25 (STEMCELL)

DMEM-F12 Medium (MULTICELL)

PBS (BIOMATIC)

Dimetilsülfoksit (GIBCO)

Penicilin-Streptomycin (GIBCO)

Fetalbovine serum (FBS)

Bioassay Technology Laboratory ELISA Kit (SOD, CAT ve GPx)

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

ELISA Cihazı (BMG LABTECH)

VortexMixer (Dragon Lab)

Manyetik Karıştırıcı (Daihan)

Biyogüvenlik Kabini Class 2 (Bilser)

Santrifüj (Nüve NF 800R)

Hassas Terazî (Radwag AS 220)

Mini santrifüj (Eppendorf)

Su Banyosu (Mettler WNB22)

İnverted Mikroskop (ZEISS)

Otomatik Pipetler (Nichipet)

CO<sub>2</sub> İnkübatör (Mettler)

Elektroforez cihazı (CleverScientific)

pH metre (MettlerToledo)

Pipet Aid (Macroman)

Otoklav (Nüve OT 23S)

### **3.3. Kullanılan Gereçler**

Tek Kullanımlık Enjektör

Plate (96 kuyucuklu) (CITOTEST)

Mikropipet ucu (10, 100, 1000 $\mu$ l)

Steril Filtre (BD FALCON)

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

Şırınga filtreleri (0,22  $\mu$ m)

Santrifüj Tüp 15 mL (NEST)

Santrifüj Tüp 50 mL (NEST)

Plate (6 kuyucuklu)

T75 (75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flask)

T25 (25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flask)

### **3.4. Yöntemler**

Bu tez çalışmasında, hücre tabanlı yapılan işlemlerde sterilizasyona önem verilmiş ve kullanılan hücrelerin stres altında olmaması için bu hücrelere nüfuz eden çözelti veya çözücüler 37°C'de işlem görmüş ve santrifüj işlemleri 5 dakika arayla düşük RPM'de gerçekleştirilen titiz bir yaklaşım benimsenmiştir. Bu çalışma kapsamında *R. melanophthalma* ve *R. chrysoleuca* türlerinin antikanser özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmış olup agresif özellikte olan hücre hattı MDA-MB-231 hücreleri uygun görülüp kullanılmıştır. Bu kullandığımız meme kanseri hücre hattı ise ATCC (Amerikan Tıp Kültür Merkezi) firmasından tedarik edildi.

#### **3.4.1. Likenin Ekstrakte Edilmesi**

Tamamlanması yapılan liken örneklerinden 10 gr tartılarak havanda toz haline ulaşıncaya kadar öğütülme işlemi yapıldı. Bu toz haline gelen liken örnekleri ise Kocakaya ve arkadaşlarının (2021) yöntemine göre %80'lik metanol kullanılarak ekstre edildi ve işlem sonunda elde edilen özler süzüldü. Döner buharlaştırıcının basıncı azaltılarak konsantre edildi. Elde ettiğimiz kuru ekstratlar deneyler için kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Ekstreler %70'lik alkolde çözüldü ve seyreltme işlemleri DMEM besiyerleri kullanılarak yapıldı. Liken dozları plaka yüzeyinde kirli bir görüntü elde etmemek için ve partiküllerden arınması amacıyla 0,22 mikronluk bir filtre ile süzme işlemi gerçekleştirildi.

### **3.4.2. Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi**

#### **3.4.2.1. Hücre Kültürü Besiyeri Hazırlanması**

MDA-MB-231 hücre hattının dondurulması, çözülmesi ve pasajlanması gibi işlemler için kullanılan besiyer hazırlığı oldukça yaygın kullanılan bir uygulamadır. Bu besiyerleri hazırlarken birbirinden farklı 3 çözelti kullanılmıştır. Bunlar; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal buzağı serumu (FBS), penisilin/streptomisin antibiyotığıdır. Bu besiyerlerinin steril bir ortamda işlemleri yapıldıktan sonra filtreden geçirilip otaklavlanmış şişede +4°C'de saklanmıştır. Çalışmaların hemen öncesinde kullanıma başlamadan besiyerinin hücrelere verilebilmesi için 37°C'deki su banyosunda inkübe işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### **3.4.2.2. MDA-MB-231 Hücre Hattının Kültüre Aktarılması**

MDA-MB-231 hücreleri, kryo tüplerinde dondurularak saklanmıştır. Daha sonra çalışmaya başlamadan önce bu hücreler -80°C'den alındı ve su banyosunda çözülmesi sağlandı. Hücrelerin tamamen çözülmesinin ardından hızlı bir şekilde santrifüj tüplerine aktarıldı. DMSO'nun hücrelere olan etkisini azaltmak amacıyla üzerlerine yavaşça 5 mL taze besiyeri eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı. Final volümde 1500 RPM hızında 4 dakika boyunca santrifüj edildi ve hücre pelletinin üzerine yeni besiyeri eklenerek flasklara ekimleri gerçekleştirildi. Hücrelerin çoğalması için, %5 karbondioksit içeren bir ısıtmalı inkübatör kullanılarak 37°C sıcaklıkta inkübe işlemi gerçekleştirildi. Hücreler, yaklaşık olarak %70 ila %80 doluluk seviyesine ulaşana kadar yaklaşık iki günde bir değiştirildi ve morfolojik yapıları, çoğalma hızları, canlılıkları invert mikroskop ile takibi gerçekleştirildi.

#### **3.4.2.3. MDA-MB-231 Hücre Hattının Pasajlanması**

Hücre pasajlama işlemi hücre kültürü kaplarındaki tek tabaka halinde büyüyen hücre dizilerini tripsin yardımıyla yüzeyden yavaşça alarak başka bir kültür kaplarına aktarma işlemidir. Hücreler yaklaşık olarak %70-%80 oranında doygunluğa ulaştığında her iki günde bir pasajlama uygulaması yapıldı. Pasajlama sırasında flask yüzeyinde bulunan ve buraya yapışık halde olan canlı hücrelerin yapısını bozmadan flaskın yüzeyine yapışık olmayan ölü hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flask için ortalama 3 mL fosfat tampon solüsyonu (PBS) kullanılarak yıkama işlemi ile temizlendi. Ardından PBS ortamdan uzaklaştırıldı. 2-3 dakika

beclendikten sonra hücrelerin kalkıp kalkmadığı bulanıklık durumlarına ve daha sonrasında ise mikroskop ile hücrelerin hareket edip etmediğine bakıldı. Hücreleri flask tabanından ayırmak için 3 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek inkübatöre yerleştirildi. Tripsin EDTA sayesinde hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlandı ve bu süreç bitiminde hücrelerin uzantılarından ayrılıp yuvarlak görünümüne geçmesi gerçekleştirildi. Hücrelere etki eden Tripsin'in etkisinden korunmak için besiyerleri ekledikten sonra, hücrelerin falcon tüpüne transfer işlemi gerçekleştirildi ve ardından 1500 RPM'de 4 dk santrifüj işlemi uygulandı. Tüp içinde kalan hücre pelleti taze besiyeri ile süspansiyon edilerek iki farklı flaska bölünerek pasajlama gerçekleştirildi. Bir kez daha pasajlanan hücrelerin dağılımına invert mikroskop ile bakıldı. Son olarak flaskaların üzerine tarih ve pasaj sayıları da yazıldı ve inkübatöre kaldırıldı.

#### **3.4.2.4. MDA-MB-231 Hücre Hattının Muhafaza Edilmesi**

Flaskın içi %80-%90 oranında dolduktan sonra fazla besiyeri atıldı ve ardından 25 cm<sup>2</sup>'lik flaska 2 mL PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flask için 1 mL Tripsin-EDTA ile karıştırıldı ve yüzeyden uzaklaştırıldı. Sonrasında ise 1000 RPM ile 5 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve tripsin ortamdan uzaklaştırıldı. Hücre pelleti içerisine %5 Dimetilsülfoksit (DMSO) ve Fetal Bovine Serum (FBS) karışımı eklenerek kryo tüplerine aktarımı gerçekleştirildi. Bu tüpler daha sonra hızlıca donduruldu ve bir sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

#### **3.4.2.5. Hücre Sayımı**

Hücre sayımı Tripan mavisi (Trypan Blue Exclusion) olan negatif yüklü boya kullanılarak yapılmıştır ve Toma lamında saymak için boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tripan mavisi kullanmamızdaki amaç canlı hücrelerin ışık altında çok daha parlak görünmesini sağlamasıdır. Cansız/ölü hücreler boyayı hücrenin içine aldığından mat/mavi görünüm rengindedir. Canlı/sağlıklı hücreler boyayı dışladığından mikroskop altında parlak beyaz renk görünümündedir. Araştırmalarımız sırasında 20 µl hücre süspansiyonu ve 20 µl %0,5'lik tripan mavisi karıştırılmış olup hazırlanan bu karışımdan 20 µl alındı ve lam üzerinde hücre sayımı gerçekleştirildi. Bu yapılan sayıma göre canlı ve cansız hücrelerin yanı sıra toplam hücre sayısı belirlendi. Bu veriler kullanılarak hücrelerin canlılık oranları hesaplandı.

Aşağıdaki formül ile süspansiyonun 1 mililitresindeki hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı/mL} = \text{Sayılan bölgelerin ortalama sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4$$

### 3.4.2.6. MTT Yöntemi

Hücrenin canlılığını belirlenmesi, hücre büyümesi ve hücre ölümünün değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürü esasına dayalı MTT yöntemi kullanılmıştır. Aynı zamanda bu yöntem, hücrelerde oluşan sitotoksisiteyi belirlemede çok sık kullanılmaktadır. Metabolik olarak aktif hücrelerin MTT adı verilen bir bileşiği, mor formazan kristallerine dönüştürme yeteneğine dayanır. Formazan oluşumu ise sadece aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde gözlemlenmektedir. Bundan kaynaklı canlı hücrelerin yoğunluğu arttıkça formazan kristallerinin sayısının artmasını ve bu şekilde görülmesini sağlarken öte yandan ölü hücrelerde formazan kristallerinin oluşmaması veya belirgin gözükmemesi beklenmektedir. Formazan oluşup oluşmamasından kaynaklı kuyucuklarda oluşan renk değişiklikleri spektrofotometrede değerlendirilerek analiz edildi (Stockert vd., 2012; Erkekoğlu & Baydar, 2021).

#### 3.4.2.6.1. MTT Yöntemi ile MDA-MB-231 Hücreleri Üzerinde *Rhizoplaca melanophthalma* ve *Rhizoplaca chrysoleuca* likenlerinde LC<sub>50</sub> Belirlenmesi

96 kuyucuklu düz tabanlı steril plakalara hücre/kuyu şeklinde ekim işlemi uygulandı ve her bir kuyucuğa  $1 \times 10^4$  oranında kuyucuklara eşit miktarda ekim yapıldıktan sonra hücre çoğalmasını görmek adına inkübasyona bırakıldı.

24 saat süren inkübasyon süresinin sonunda *R. melanophthalma* ve *R. chrysoleuca* likenlerinin farklı dozları hücrelere uygulandı. Bu iki liken türünden alınan düz miktarları besiyeri ile belirli dilüsyonlar kullanılarak hazırlandı. Bu doz oranları ise sırasıyla; 184-92-46-23 µg/mL'dir. Ayrıca kontrol grubu oluşturularak deneyler yürütüldü.

Deneyin kontrol koşullarını sağlamak amacıyla kontrol grubu için yalnızca uygulama gruplarındaki aynı hacimdeki besiyeri ekleme işlemi yapıldı.

Maddenin etki etmesi amacıyla hücre plağına 48 saatlik inkübasyon işlemi uygulandı.

48 saatin ardından hücrelerin üzerine yeni hazırlanmış MTT solüsyonundan kontrol dahil olmak üzere 25 µl olacak şekilde eklendi ve 2,5 saat inkübe edildi (Merck, Cell Proliferation Kit kullanılmıştır).

Kuyucuklara kitin içerisinden çıkan Solubilization buffer tamponundan 150 µl eklenmiştir ve formazan kristallerinin çözünmesi için 2 saat inkübatöre bırakıldı.

2 saatin ardından plate hafifçe çalkalandı ve spektrofotometrik olarak 570 nm absorbans değerleri ölçüldü.

Kontrol grubu ile absorbans değerleri karşılaştırılarak LC<sub>50</sub> dozu bulundu. *R. melanophthalma* için LC<sub>50</sub> değeri 92 µg/mL, *R. chrysoleuca* için ise LC<sub>50</sub> değeri 46 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

### **3.4.3. DNA Hasarının Tespit Edilmesi**

#### **3.4.3.1. Komet Testi Yöntemi**

MDA-MB-231 hücre hatlarını flask yüzeyinden kaldırıp yüzer konuma getirmek için tripsin ile muamele edildi. Hücre sayımı için Thoma lamı yapıldı.

Hücre sayımı işleminden sonra hücreler tekrardan 6 kuyucuklu plaklara ekildi ve uygun şartlarda 1 gece inkübe edildi.

184-92-46 µg/ml LC<sub>50</sub> ve LC<sub>100</sub> liken grupları eklenerek tekrardan 2 gece inkübe edildi.

1:1 oranında agaroz (LMA) ile pipetlendikten sonra liken grupları ve kontrol lamlara yayılarak lamele kapatıldı. Daha sonrasında +4°C’de 20 dakika hücreler bekletildi.

Donmuş agaroz dahilinde bulunan hücreler lizis çözelti karışımı ile 1 saatlik muamele edildi.

Elektroforez işlemi için tankın içerisine yerleştirilen lamlar solüsyon içerisinde 250 V’luk güç verilerek DNA’lar yürütüldü.

Distile su (dH<sub>2</sub>O) ile 3 defa yıkanan lamların nötralizasyon işlemi yapıldı.

Floresan mikroskopunda görüntü almak adına son işlem olarak etidyum bromür (EtBr) ile boyama işlemi gerçekleştirilip hücre fotoğrafları çekildi.

BAB programı kullanılarak kontrol ve liken uygulama grupları arasında meydana gelen DNA hasarı, yüzde DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti istatistiksel verileri çıkarıldı.

#### **3.4.4. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi**

MDA hücre membranının yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu yan ürün olarak oluşmaktadır. Hücre zarı yapısındaki bu özel yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu meydana gelmektedir (Oropesa vd., 2009). Çalışmamızda “Bioassay Technology Laboratory ELISA Kit” markası kullanılarak deneyler yapılmıştır. İlk olarak hücrelerin flaskalara ekimi gerçekleştirildi ve ardından 24 saat boyunca inkübe işlemi yapıldı. Daha sonra liken uygulama grupları eklendi (LC<sub>50</sub> ve LC<sub>100</sub> değerleri) ve hücreler iki gece (48 saat) inkübatöre bırakıldı. 48 saatin ardından bu inkübasyon sonunda flaskın yüzeyine yapışmış halde olan bu hücreler tripsin yardımıyla yüzeyden ayrıldı ve 1500 RPM’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Kullanılan kitin prosedürüne göre standartlar hazırlandı

ve bu standartlar kit içerisinde çıkan 96'lık plakaya 50 µl olacak şekilde eklendi. Geri kalan kuyucuklara ise liken uygulama gruplarından gelen örneklerden 40 µl koyuldu. Daha sonra MDA seviyelerini ölçmek ve MDA'yı tespit etmek için uygulama gruplarının her birinin üzerine 10 µl anti-MDA antikoru eklenmiştir. Daha sonra numune kuyucuklarına ve standartlara 50 µl streptavidin-HRP eklenerek 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda bütün kuyucuklara 0,35 mL yıkama tamponu ile 3 sefer yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 50 µl standart solüsyon A ve 50 µl standart solüsyon B eklenip tekrardan 10 dakika 37°C'de inkübe işlemi yapıldı. Son adımda ise her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu koyuldu ve mikrolaka okuyucu 450 nm dalga boyuna ayarlanarak ölçümler yapıldı.

#### **3.4.5. SOD, CAT ve GPx Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

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

Hücreler önceden hazırlanan flasklara ekilip 24 saat inkübe edildi. Sonrasında liken uygulama grupları eklenerek iki gece daha inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tripsin yardımıyla yapışan hücreler kaldırıldı ve 15 dakika 2000 RPM'de santrifüj edildi.

İlk olarak standart çözelti hazırlandı ve 96 kuyucuklu plakanın her birine 50 µl standart eklendi. Geri kalan kuyucuklara ise liken uygulama gruplarından 40 µl eklenerek işlem tamamlandı. Ardından her bir plakadaki uygulama gruplarının üzerine 10 µl anti-SOD-CAT-GPX çözeltisi eklendi.

Önce standart ve numune kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklenerek 37°C'de 1 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından tüm kuyucuklar 3 kez 0,35 mL yıkama tamponu ile yıkandı. Sonrasında tüm kuyucuklara 50 µl standart solüsyon A ve 50 µl standart solüsyon B eklenerek 37 °C'de 10 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Son adımda ise yine tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek 450 nm'ye ayarlanan mikrolaka okuyucu ile ölçüm yapıldı.

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

Etidyum bromür ve akridin oranj DNA bağlayan floresan boyalardır. Hücre zarı ve nükleusunda olan değişikliklerin görüntülenmesini sağlayan bir boyama yöntemi olarak tanımlanmaktadır.

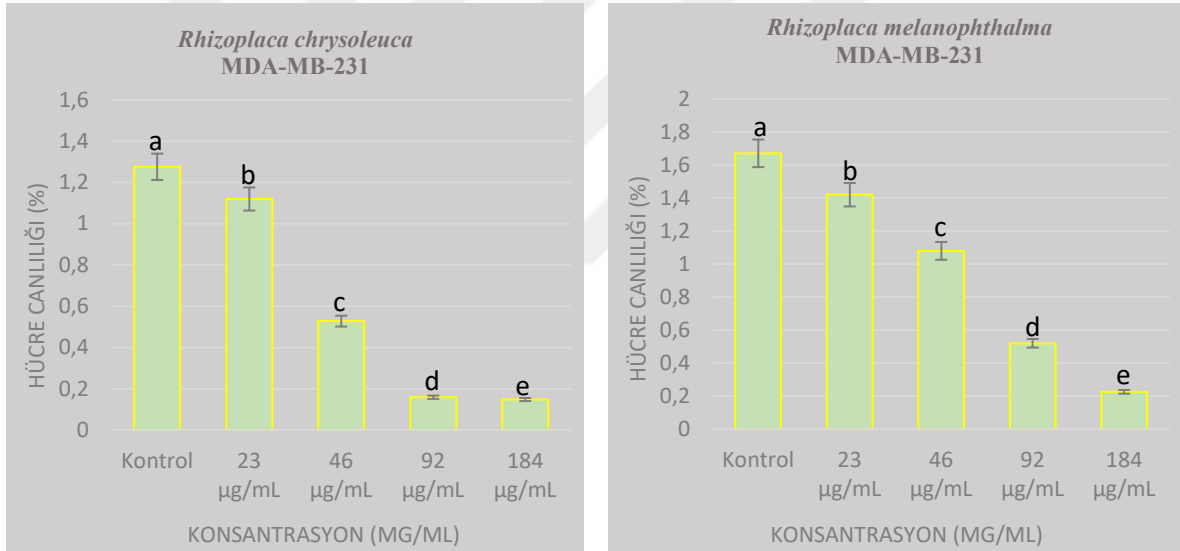
Çalışma sırasında 96'lık well plate kullanıldı. Hücrelerin yapışması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* dozları (LC<sub>50</sub> ve LC<sub>100</sub>) ve kontrol olmak üzere gruplar oluşturuldu. Hücreler PBS tamponu ile yıkanmasının ardından tripsin-EDTA solüsyonu ile boyanın ekleneceği ependroflara aktarıldı. Ardından aktarılan bu hücreler 1:1 oranda akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EtBr) ile hazırlanan boya ile aynı oranda pipet edildi ve lamlara serildi. Üzeri lamel ile kapatılıp 10 dakika ışısız ortamda bekletildi. Çalışma kapsamında uygulama gruplarının apoptozdaki rolü ve kontrol grubunun durumlarının değerlendirilmesini görmek için AO/EB ile çift boyama yapıldı. Ardından floresan mikroskobu kullanılarak hücrelerin morfolojisi gözlemlendi (Kılınç vd., 2004).



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. MTT Testi Sonuçları

Çalışmamızda hücrelerin canlılığı MTT boyası ile test edilmiştir. Ön denemeler sonucunda kontrol grubuna yalnızca besiyeri eklenip ardından hücrelerin sağlıklı ve canlı bir morfolojiye sahip olduğu kararına varıldı. Elde ettiğimiz cihaz verilerine göre, uygulanan likenin artan dozlarının spektrofotometrede okuma sonucu alınan verilerine baktığımızda *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likeninin MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalmasını belirgin bir şekilde azalttığı bu sayede kansere karşı koruyucu etkiler sunduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmalar yapılırken blank değerleri dikkate alındı ve sonrasında bu değerler çıkarılarak hesaplama yapıldı. Hücrelerin canlılığının kontrol grubuna göre yarı yarıya azaldığı ve LC<sub>50</sub> değerleri *R. chrysoleuca* için 46 µg/mL ve *R. melanophthalma* için 92 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



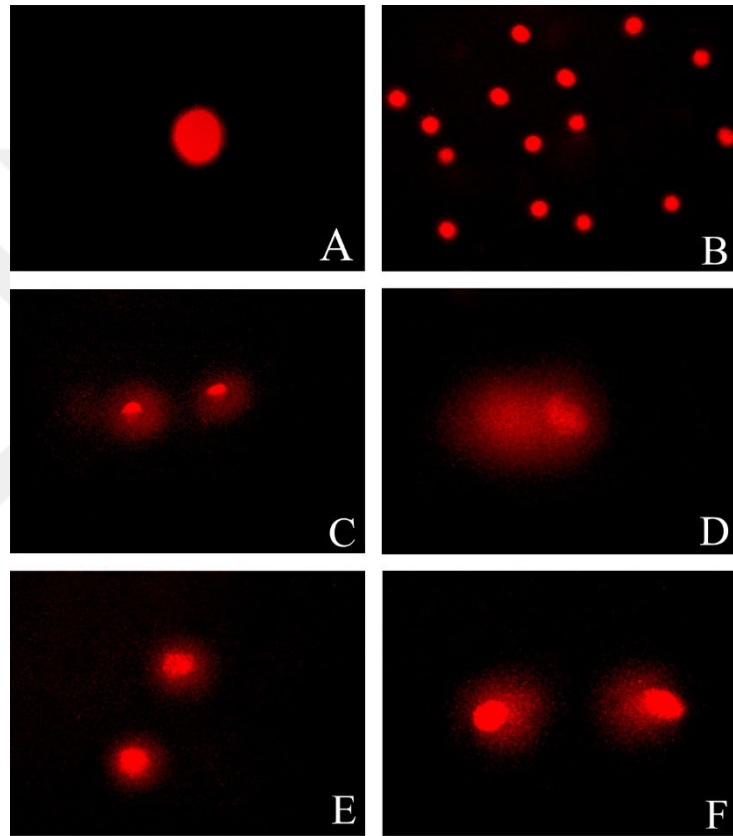
**Şekil 4.1.** *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma*'nın MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

### 4.2. Komet Testi Analiz Sonuçları

Ortaya koyduğumuz bu çalışmamızda kontrol, hücrelerin yarısını ve tamamını öldüren değerlerden (LC<sub>50</sub>-LC<sub>100</sub>) gruplar oluşturularak *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatları üzerinde yapmış olduğumuz genotoksisite tayini verileri komet testi ile elde edilmiştir. Tüm var olan örnekler için BAB uygulamasının genetik araçları kullanılarak bire bir ayrı ölçümleri sağlanmıştır. Liken

uygulama gruplarımız ve kontrollerin kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve DNA hasarı ( $\pm$ SD) % DNA verileri ölçülerek hesaplandı.

Komet testi üzerinde denenen likenlerin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatları üzerindeki istatistiksel veriler Tablo 4.1.'de belirtilmiştir. Uygulama gruplarının floresan mikroskop beraberinde elde edilen görsel veriler Şekil 4.2.'da belirtilmiştir. Farklı dozlarda MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde uygulanan liken grupları ve kontrol grupları analiz edildiğinde MDA-MB-231 hücre hatlarının üzerinde bir DNA hasarı olduğu gözlemlenmiştir.



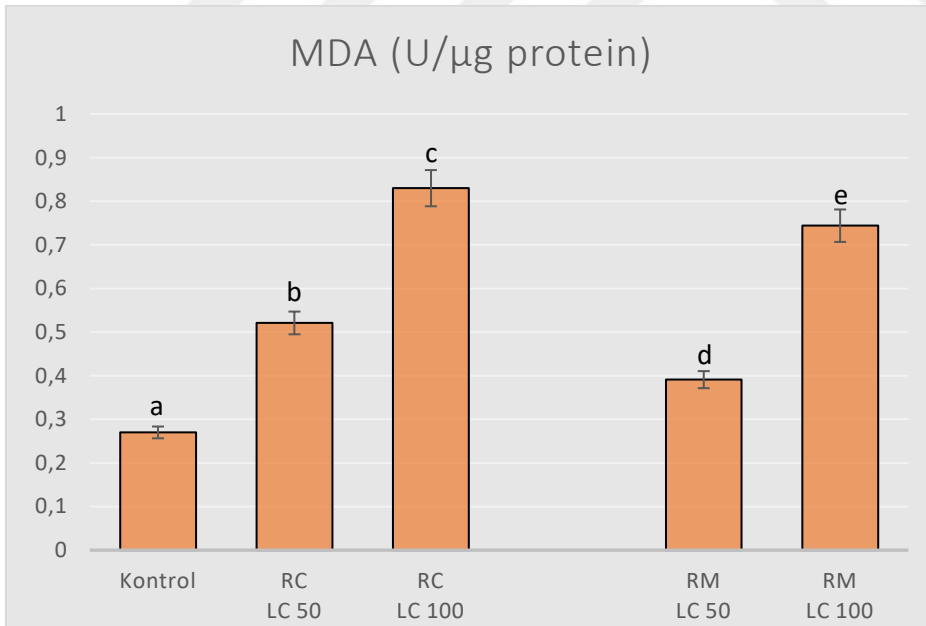
**Şekil 4.2.** MDA-MB-231 hücrelerinin liken uygulama grupları ve floresan mikroskop ile çekilen fotoğrafları. Kontrol grubu (A, B), 46  $\mu$ g/mL *R. chrysoleuca* likeni uygulanan grup (C), 92  $\mu$ g/mL *R. chrysoleuca* likeni uygulanan grup (D), 92  $\mu$ g/mL *R. melanophthalma* likeni uygulanan grup (E), 184  $\mu$ g/mL *R. melanophthalma* likeni uygulanan grup (F).

**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	11,3 $\pm$ 1,2	4,5 $\pm$ 0,05	0,5 $\pm$ 0,0006
LC <sub>50</sub> RC $\mu$ g/mL	41,6 $\pm$ 8,2	14,8 $\pm$ 2,1	6,15 $\pm$ 0,17
LC <sub>100</sub> RC $\mu$ g/mL	95,9 $\pm$ 17,1	30,2 $\pm$ 3,2	28,96 $\pm$ 0,54
LC <sub>50</sub> RM $\mu$ g/mL	32,7 $\pm$ 5,4	13,8 $\pm$ 1,9	4,51 $\pm$ 0,10
LC <sub>100</sub> RM $\mu$ g/mL	74,4 $\pm$ 10,2	21,6 $\pm$ 2,7	16,07 $\pm$ 0,27

### 4.3. MDA Seviyesinin Değerlendirilmesi

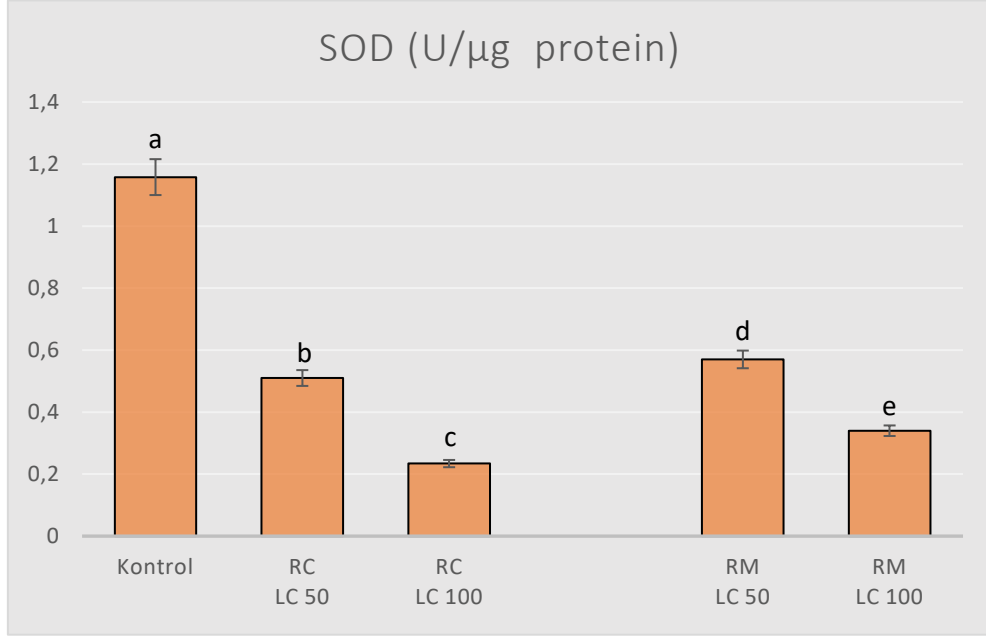
Meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerine farklı dozlarda uygulanan *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likeninin vermiş olduğu sonuçlara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerini önemli derecede yükselttiği görüldü. ( $P < 0,05$ ) MDA seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4.3.'te gösterilmektedir.



**Şekil 4.3.** *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenleri kontrol ve etkin doz gruplarının MDA seviyeleri (Sütunlar üzerindeki aynı harfleri taşımayan gruplar birbiri arasındaki farklılığı ( $P < 0,05$ ) ifade etmektedir).

#### 4.4. SOD Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

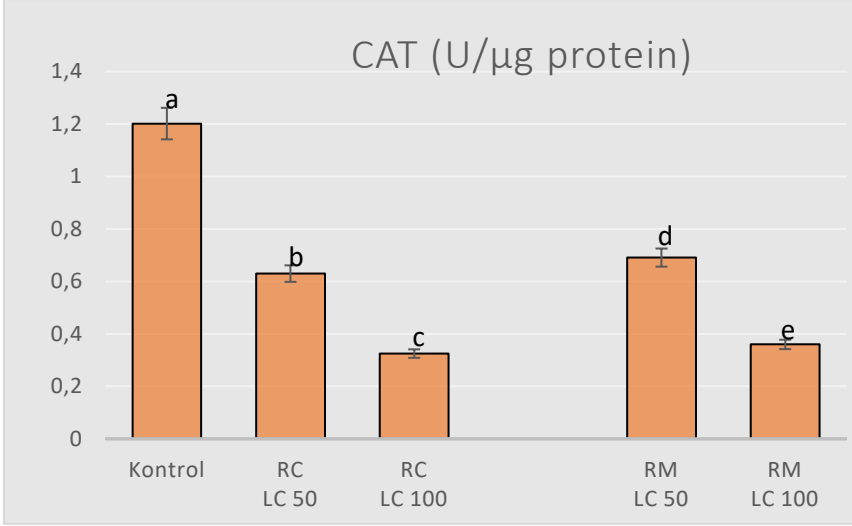
*R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenleri MDA-MB-231 hücrelerine artan ve etkin konsantrasyonlarda uygulandığında SOD enzim aktivitesini azalttığı gözlemlendi. Bu elde edilen sonuç kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitesinin doza bağlı olarak enzim çalışmasını azalttığını göstermektedir. ( $P<0,05$ ) SOD enzim aktivitesinde elde ettiğimiz veriler Şekil 4.4.'te verilmiştir.



**Şekil 4.4.** *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenleri kontrol ve etkin doz 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

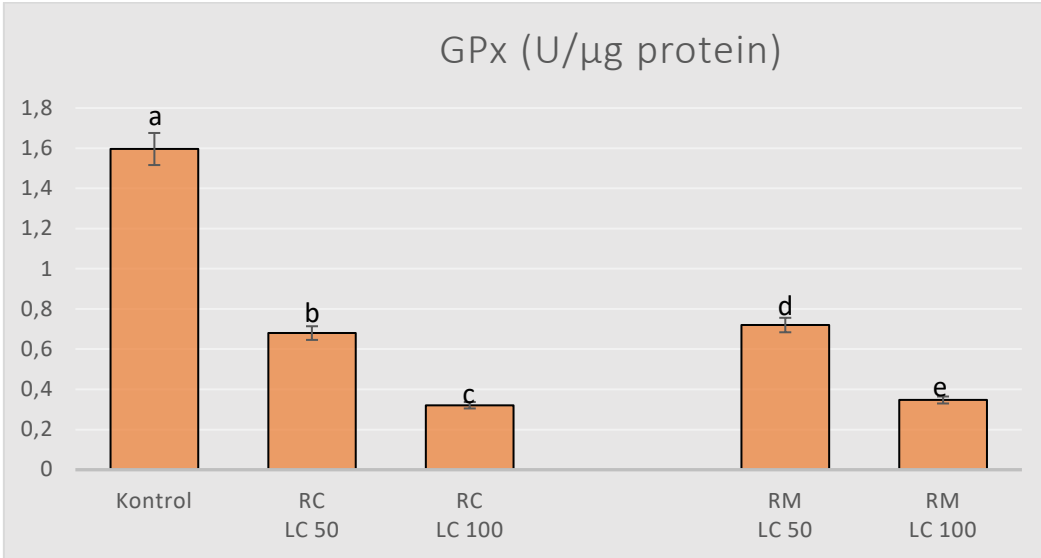
*R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatları üzerinde yapmış olduğumuz CAT enzim aktivitesi değerlendirme çalışmamızda enzim aktivitesinde düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. ( $P<0,05$ ) CAT enzim aktivitesindeki değişikliklere dair oluşan veriler Şekil 4.5.'te verilmiştir.



**Şekil 4.5.** *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* kontrol ve etkin doz gruplarının CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (Sütunlar üzerindeki aynı harfleri taşımayan gruplar birbiri arasındaki farklılığı ( $P < 0.05$ ) ifade etmektedir).

#### 4.6. GPx Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

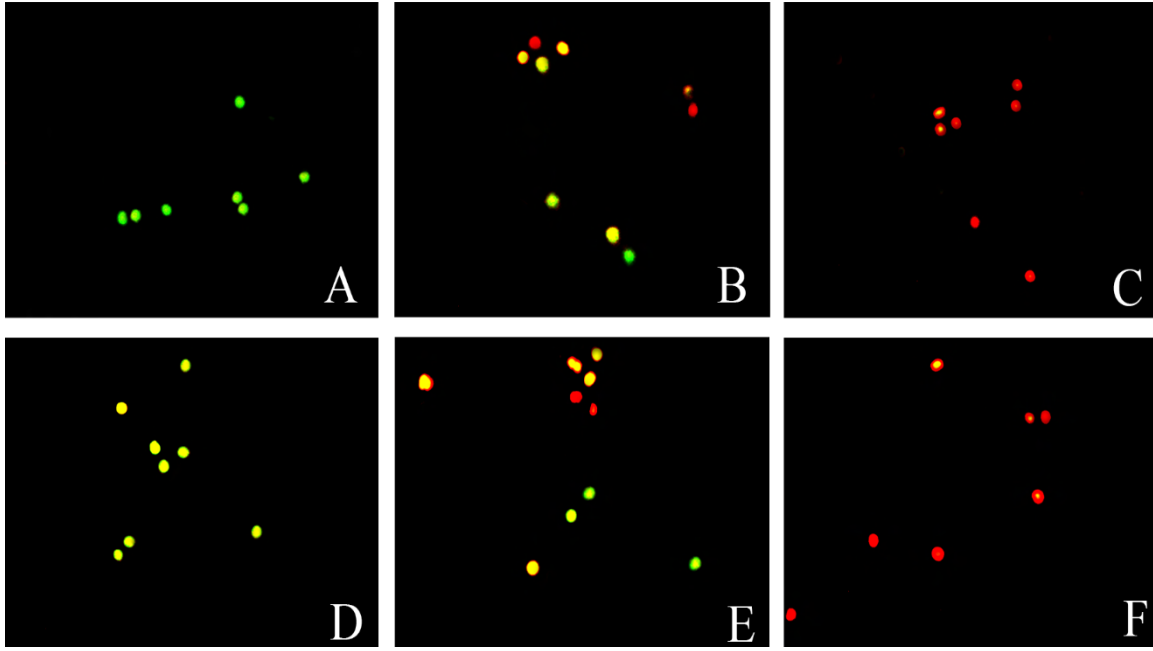
GPx sonuçlarına baktığımızda *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerini MDA-MB-231 hücrelerine etkin dozlarda uyguladığımızda GPx enzim aktivitesini azaldığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GPx enziminin aktivitesinde azalış gösterdiği belirlenmiştir. ( $P < 0,05$ ) GPx enzim aktivitesindeki sonuçlar Şekil 4.6.'da verilmiştir.



**Şekil 4.6.** *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* kontrol ve etkin doz gruplarının GPx enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (Sütunlar üzerindeki aynı harfleri taşımayan gruplar birbiri arasındaki farklılığı ( $P < 0.05$ ) ifade etmektedir).

#### 4.7. Akridin oranj- etidyum bromür boyası ile Apoptoz Saptanması

Floresan mikroskobu yardımıyla akridin oranj/etidyum bromür boyası ile boyanmış hücrelerin erken, geç apoptoz ve nekroz durumlarından hangisine uğradığı ve liken ekstraktlarının artan dozlarının etkileri belirlenmiştir. Periyodik şekilde artan dozlarda 46-92-184 µg/ml LC<sub>50</sub> ve LC<sub>100</sub> uygulama grupları bulunan *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin MDA-MB-231 insan meme kanseri için yapılmış bu çalışmada ortaya çıkan görsel veriler Şekil 4.7’de belirtilmiştir.



**Şekil 4.7.** MDA-MB-231 hücrelerinin liken uygulama grupları ve floresan mikroskop ile çekilen fotoğrafları. *R. chrysoleuca* kontrol grubu (A), 46 µg/ml *R. chrysoleuca* uygulanan grup (B), 92 µg/ml *R. chrysoleuca* uygulanan grup (C), *R. melanophthalma* kontrol grubu (D), 92 µg/ml *R. melanophthalma* uygulanan grup (E), 184 µg/ml *R. melanophthalma* uygulanan grup (F).

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanser modern çağımızın en önemli kronik hastalıklarından biri olarak ilk sıradadır. Her ne kadar kanser modern çağ hastalığı olarak görülse de hastalığın kökenine indiğimizde eski zamanlara dayandığını savunan kanıtlar yer almaktadır. Yapılan araştırmalar sayesinde kanserin kontrolsüz ve hızlı bir şekilde çoğaldığı gözlemlenmiştir. Bu gözlem canlı yaşamının parçası olan kanserin varlığını gösteren kanıtlardan birisidir (Sert & Küçükkılıncı, 2022). Türkiye’de ve dünyamızda kanser hastalığına yakalanma olasılığı her geçen gün artmaktadır. Bu artışın birçok farklı çeşitli nedeni bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü’nün 2018 verilerine bakıldığında 18,1 milyon yeni vaka tespit ettiğini ve bunun sonucunda ölüm sayılarının 9,6 milyon olduğunu açıklamıştır. Bu verilere göre her beş erkekten biri ve her altı kadından biri bu teşhis ile karşı karşıya kalacaktır (Akyolcu vd., 2019; Scully vd., 2012; Siegel vd., 2019). Ayrıca son beş yılda bu sayının ise 43,8 milyon olarak artması beklenmektedir. Artan bu vaka sayısının en temel nedenlerinden biri yaşlı nüfusunda görülen artış, düzensiz beslenme, alkol sigara kullanımı ve kimyasal karsinojenlere maruz kalmaktır. Bu nedenlerle beraber ekonomik ve sosyal gelişmelerle bağlantılıdır. Dünya genelinde gelişen teknoloji sayesinde yeni kanser vakalarının tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Pilleron vd., 2021; Ferlay vd., 2015).

Kadınlarda sık görülen kanser türleri sırasıyla meme kanseri, tiroid kanseri, kolorektal kanser, uterus korpusu kanseri ve solunum sistemi kanserleridir ve dünya genelindeki birçok ülkenin verileri ile paralellik göstermektedir (Siegel vd., 2019; Jemal vd., 2009). Son 20 yıl boyunca meme kanseri ölüm oranlarında azalma gözlemlenmektedir. Özellikle ABD’de 2005-2009 seneleri arasında 50 yaş altındaki kadınlarda yıllık olarak %3’lük bir azalma gözlemlenirken 50 yaş üstü kadınlarda yıllık %2’lik bir azalma görülmüştür. Genellikle artan teknoloji ile birlikte beraberinde gelen tedaviler ile birlikte bu olumlu eğilim, erken teşhis ve etkili tedavi yöntemlerindeki ilerlemelerin katkısıyla gerçekleşmektedir (Jemal vd., 2011; Colditz & Bohlke, 2014).

Likenler kendilerini meydana getiren yeşil alg ve siyanobakteriler ile mantarların birbirlerine karşılıklı fayda sağladığı ilişki sonucunda oluşan organizmalardır. Bu iki yaşam formu bir araya gelerek likenleri meydana getirir (Romagni & Dayan, 2002). Kanser vakalarında gözlenen artışla beraber son on yılda ilaç keşifleri hızlandırılmıştır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda bilim insanları likenlerin içerdikleri biyoaktif bileşenlerin kanser hücrelerine etkilerini incelemektedir ve potansiyel kanser tedavilerinin geliştirilmesine

katkı sağlamaktadır. Son yıllarda birçok farklı liken türünden ekstre edilen bileşenler kanser araştırmalarında incelenmiş olup olumlu sonuçlar vermiştir. Örneğın protolichesterik asit, atranorin ve usnik asit gibi liken bileşenlerinin bazı kanser türlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Antikanser ilaçlarıyla birlikte kullanıldığında kanser tedavisinde güçlü adaylar arasında yer almaktadır (Özenoğlu vd., 2013).

Yapılan bir çalışmada şili'den toplanan likenlerin aseton özütleri ile akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinin hareketliliğini inhibe ettiği ortaya koyulmuştur. Bu analizlere göre çalışmada A549 hücrelerine bakıldığında *R. melanophthalma* likeninin 5 µg/mL konsantrasyonunda A549 hücrelerinin göçünü engellediği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak A549 hücrelerinin motilitesine karşı inhibe edici özellik sergilediğini göstermektedir (Yang vd., 2015).

Cilt kanseri ve lösemi gibi kanser hücre hatları üzerinde araştırmacılar tarafından çalışılan *Usnea* liken ekstraktları hücre proliferasyon testi ile değerlendirilerek antikanser etkileri ortaya konulmuştur (Zambare & Christopher, 2012).

Buğrahan Emsen ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf türünden izole edilen olivetorik asit ve physodik asit ile *R. melanophthalma* (DC.) Leuckert türünden izole edilen psoromik asit liken sekonder metabolitlerinin antitümör potansiyeli ilk defa insan beyin hücre hattı U87MG-GBM ve primer rat serebral korteks çalışılmıştır. Antitümör aktivitesi incelemeyi amaçlayan Emsen'a ait *in vitro* bir diğer çalışmada ise *P. furfuracea* (L.) Zopf (Parmeliaceae) ve *R. melanophthalma* (DC.) Leuckert (Lecanoraceae) likenlerinden izole edilen olivetorik asit, physodik asit ve psoromik asitin insan U87MG-GBM ve sıçan serebral korteks hücre hatları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak ise bu metabolitlerin sitotoksik etkilerinin konsantrasyon, LDH aktivitesi ve DNA hasarı üzerinde pozitif etkisi olduğu gözlemlenmiş olduğu belirtilmiştir (Emsen vd., 2016).

2014 yılında Gajendra Shrestha tarafından yapılan Kuzey Amerika'da bulunan liken türlerinin antikanser aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada *R. chrysoleuca* likeni de çalışma içerisinde değerlendirmeye alınmıştır ve IC<sub>50</sub> değeri 29.2 ± 1.0 bulunarak Kuzey Amerika konumunda yer alan 17 liken arasında antikanser etkiye sahip olma potansiyeli yüksek olan ilk 3 liken arasında yer almıştır (Shrestha vd., 2015).

Kanser tedavilerinde liken bileşikleri büyük önem taşımaktadır. Örneğın atranorin, usnik asit ve protolikhesterinik asit gibi liken bileşikleri kanser türlerine karşı etki göstermektedir ve diğer antikanser ilaçlarla bir araya getirilerek kanser tedavileri için potansiyel adaylar

olarak kabul edilmektedir. *R. melanophthalma*, *Cornicularia aculeate* ve *Cetraria islandica* türlerinde Protolikhesterinik asit ilk defa *Usnea albopunctata*'dan belgelenmiştir. İnsan prostat kanseri hücreleri olan LNCaP ve DU-145 üzerindeki *in vitro* şartlar altında tümör hücre büyümesi inhibe edici etkisi incelenmiştir. Aynı zamanda bu asit ile meme kanseri hücre hatları olan SKBR-3 ve T47D hücrelerine de bakılmıştır ve Protolikhesterinik asitin SK-BR-3 hücre hatlarına karşı antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde protolikhesterinik asit, insan nöroblastom HeLa, ve lösemi (K562) hücre hatlarının yapılarını etkilemiştir (Dar vd., 2022).

Yapılan başka bir çalışmada Kumar ve ark. (2014), n-hekzan ile antioksidan kapasitelerini ve HepG2 ve RKO kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerine bakmıştır. Sonuç olarak *R. chrysoleuca*'nın n-hekzan ekstraktı yüksek seviyede antioksidan aktivite göstermiştir (Kumar vd., 2014).

Dünya da en çok görülen kanserlerden biri olan meme kanseri üzerinde birçok çalışma ve ilerleme olmasına rağmen halen görülen kanser vakaları arasında 2.sırada yer almaktadır. Yapılan birçok çalışmada ise liken türlerinin kanser hücreleri üzerinde antisitotoksik özellikleri sayesinde etkili olabilecekleri gösterilmiştir. *R. chrysoleuca* likeni HepG2 hücre hattında, *R. melanophthalma* likeni ise U87MG-GBM hücre hattında, dahil olduğu araştırmalarda inhibe edici olduğu MTT test yöntemi üzerinde gösterilmiştir.

Bu çalışmamızda, insan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 üzerinde *R. chrysoleuca* ile *R. melanophthalma* likenleri farklı konsantrasyonlarda uygulandı ve MTT canlılık testi aracılığı ile meme kanseri hücreleri üstünde göstermiş olduğu sitotoksikite ile etkisi gözlemlendi ve *R. melanophthalma* likenlerinin 23, 46, 92 ve 184 µg/ml'lik oranlarına sahip uygulama gruplarında hücre canlılığının etki kaybettiği ve azaldığı gözlemlenmiştir. *R. chrysoleuca* likeni için LC<sub>50</sub> değeri 46 µg/ml, *R. melanophthalma* likeni için 92 µg/ml olarak tespit edilmiştir. LC<sub>100</sub> değerleri ise *R. chrysoleuca* likeni için 92 µg/ml iken *R. melanophthalma* likeni için 184 µg/ml olarak tespit edilip ölçülmüştür. Her iki liken grubu içinde sitotoksik dozlar belirlenerek devamındaki araştırmalar bu etkin dozlarla sürdürülmüştür. Çalışma sonuçlarına göre *R. chrysoleuca* likeninin sitotoksik etkisi *R. melanophthalma* likenine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *R. chrysoleuca* likeni daha düşük dozlarda aktivite sağlamıştır.

DNA hasarının kontrol ve tespiti için ise komet testine başvurulmuştur. Komet testi, genetik verinin tek ve çift sarmallarındaki kırıkları, hatalı onarılmış bölgeleri ve alkali kararsız

bölgeleri tespit etmektedir. Çalışmamız dahilinde belirli dozlarda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanan *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin kanserli hücrelerin DNA'sında hasara neden olup kansere yönelik koruyucu etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Etkin LC<sub>50</sub> ve LC<sub>100</sub> dozları ile birlikte kontrol grubu göz önüne alındığında hücre sayısının azaldığı en optimum değerler *R. chrysoleuca* likeni için 46 µg/ml iken *R. melanophthalma* likeni için 92 µg/ml olarak tespit edilmiştir. *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin etkin olduğu dozlar ile birlikte sonuçlar karşılaştırıldığında kanserli hücreler üzerinde *R. chrysoleuca* likeninin daha fazla hasar oluşturarak daha iyi etki sağladığı tespit edilmiştir.

Birçok canlının yapısında bulunabilen ve enzimatik aktioksidanlardan biri olan süperoksit dismutaz süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene katalizlemektedir (Young & Woodside, 2001). Bu araştırmada *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin uygulandığı gruba beraber süperoksit dismutaz aktivitesinin kontrol grubu karşılaştırıldığında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir ancak *R. chrysoleuca* likeninin *R. melanophthalma* likenine göre daha düşük dozlarda etki göstererek enzim aktivitesini azaltan bir etkisinin olduğu saptanmıştır. Genel olarak bakıldığında her iki likenin de LC<sub>50</sub> dozlarının enzim aktivitesini yavaşlatarak LC<sub>100</sub> dozları ile beraber durdurmaya yakın bir etki sağladığı tespit edilmiştir. Enzim aktivitesinin uygulanan dozlar ile birlikte azalması kanserli hücrelerin enzimatik aktivitesini azaltarak kansere karşı koruyucu bir etki sağladığını göstermektedir.

Organizmanın hücreleri için toksik olan hidrojen peroksit, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından ortamdaki uzaklaştırılmaktadır. Hidrojen peroksit'in H<sub>2</sub>O ve O moleküllerine parçalanması işlemi düzenleyen enzim katalaz enzimidir. Tez çalışmamızda *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin etkin LC<sub>50</sub> ve LC<sub>100</sub> dozlarının kontrol grubu ile CAT enzim aktivitelerini kıyaslama sonucunda *R. chrysoleuca* likeni *R. melanophthalma* likenine göre daha düşük dozlarda etki göstererek CAT enzimini inhibe etmesiyle birlikte her iki likende de LC<sub>50</sub> değerleri enzim aktivitesini belirgin bir biçimde yarıya indirmiştir. Katalaz enziminde oluşan artış miktarı toksik etkiye sahip olan hidrojen peroksidi inhibe etme bakımından oldukça faydalı bir durumdur ve hücrenin homeostazisini sağlayan bu enzimlerin inhibesi kanserli hücrelerin inhibe edilmesi açısından fayda sağlamaktadır.

Hidroksil radikali oluşturan hidrojen peroksit'e engel olmaya çalışan GPx ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi inhibe ederek GSSG ve H<sub>2</sub>O'nun oluşmasını sağlar. Hidrojen peroksitin yüksek seviyelere sahip

olduğunu durumlarda CAT enzimi daha aktif rol üstlenirken düşük hidrojen peroksit seviyeleri için GPx enzimi daha aktif rol üstlenmektedir. Belirli dozlardaki liken uygulama gruplarımız ile kontrol grupları kıyaslandığında CAT enzimi gibi GPx aktivitesinin de azalış gösterdiği gözlenmiş ve *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin etkin LC<sub>50</sub> ve LC<sub>100</sub> dozları kıyaslandığında *R. chrysoleuca* likeni daha düşük dozlarda etki göstererek enzim etkinliğini yarıya düşürmüştür ancak her iki liken grubunda da LC<sub>50</sub> dozları enzim etkinliği inhibe edici rol oynamıştır. Kanserli hücrelerde gözlemlenen enzim inhibisyonu hücrelere uygulanan likenlerin oksidatif stres ile meydana gelebilecek hasardan kaynaklı antikanser özellik gösterebileceği belirlenmiştir.

Yağ asitlerinin peroksidasyonu sırasında üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu MDA oluşmaktadır. Malondialdehit (MDA) hücrelerin oksidatif stres veya başka zararlı etkenle karşı karşıya kalması sonucunda meydana gelmektedir. Serbest radikallerin hücrelere zarar verdiği sürecin yan ürünüdür ve doku hasarının bir göstergesidir. MDA'nın difüze olma özelliği sayesinde mutajenik, genotoksik bir bileşiktir (Erenel vd., 1992; Monaghan vd., 2009). Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin etkin konsantrasyonlarda uygulanan hücrelerinde antioksidan aktivitesi belirgin bir azalış sergilerken aynı zamanda lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA değerinde ise bir artış görülmüştür.

Yukarıda belirtilen çalışmalarda görüldüğü gibi kanser hastalığın önüne geçmek için, kanser hücrelerini ölüme sürüklemek olabilecek sağlıklı yöntemlerden biridir. Hücrelerin planlı olarak ölme sürecine yani bu biyolojik sürece terimsel olarak apoptoz denilmektedir. Bu süreç hücrelerin biyolojik olarak kontrollü bir şekilde kendilerini imha etmesini kapsamaktadır. Apoptoz, organizmaların gelişimi, dokuların rejenerasyonu ve hücre sayılarının dengelenmesi açısından önemli bir role sahiptir.

Yaptığımız bu çalışmanın sonucuna göre *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinde MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulandığında kanserli hücrelerde apoptozu indükleyici etkisi apoptoz nekroz testi ile doğrulanmıştır. Aynı şekilde artan dozlarda uygulama grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hücre ölümünün doza bağlı olarak artışı tespit edilmiştir. Artan dozlarda uygulanan Rhizoplaca liken türlerinin ekstraktlarının hücrelerde morfolojik değişimler meydana getirmiştir. Yeşil renkli hücreler canlı hücrelerken kırmızı renkli hücreler ise ölü hücreler olarak değerlendirilmiştir. Kullandığımız bu liken türlerinin ise terapötik potansiyeli olabileceğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin MDA-MB-231

hücrelerindeki CAT, SOD ve GPx enzim aktivitelerini azalttığı ve MDA değerlerinin ise net bir şekilde artış gösterdiği belirlendi. Yaptığımız bu çalışmanın sonucuna göre *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulandığında yüksek dozlarda apoptoza neden olduğu ve aynı şekilde doza bağlı olarak meme kanseri hücre hattı DNA'sında hasar oluşturduğu komet yöntemi ile tespit edildi. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında belirli dozlarda uygulanan *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin hücreler üzerinde apoptoza yönelme açısından pozitif etki yarattığı görüntülenmiştir.

Bu tez çalışmasının sonuçlarına dayanarak elde edilen MDA değerleri ve enzim aktivitelerini aynı anda gözlemlediğimizde *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* liken ekstrelerinin etkin dozlarında MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında oksidatif aktiviteyi kayda değer bir şekilde yükselttiği gözlemlenmiştir.

Kontrol grubu ile *R. chrysoleuca* ve *R. melanophthalma* likenlerinin periyodik dozları kıyaslandığında *R. chrysoleuca* likeni için hücrelerin %50'sini öldüren LC<sub>50</sub> değerinin 46 µg/ml'lik, hücrelerin tamamını öldüren LC<sub>100</sub> değerinin ise 92 µg/ml'lik doza sahip olup *R. melanophthalma* likeni için LC<sub>50</sub> değerinin 92 µg/ml'lik, LC<sub>100</sub> değerinin ise 184 µg/ml'lik değere sahip olduğu yapılan MTT test sonuçları doğrultusunda ortaya koyulmuştur.

Birçok araştırma, likenlerin biyolojik aktiviteleri ve koruyucu anti-stres işlevleri sayesinde doğal bir antioksidan ve sitotoksik ajan olduğunu göstermektedir. Ancak yapılan çalışmalara bakıldığında biyolojik açıdan hala araştırılmamış birçok liken türü bulunmaktadır. Rhizoplaca liken türünün ise antikanser etkileri hakkında sınırlı sayıda çalışmaların olduğu tespit edilmiştir. Bu alanda yapılan çalışmaların çeşitlendirilmesi, antikanser etkilere sahip olan liken türlerinin daha kapsamlı keşfedilmesine ışık tutabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ahmadjian, V. (1982). Algal/fungal symbioses. *Progress in Phycological Research*, 1, 179-233.
- Akeren, Z., & Hintistan, S. (2021). Kanser hastalarının semptom yönetiminde aromaterapi kullanımı. *Sakarya Üniversitesi Holistik Sağlık Dergisi*, 4(3), 136-154. <https://doi.org/10.54803/sauhsd.837654>
- Akyolcu, N., Özhanlı, Y., & Kandemir, D. (2019). Meme kanserinde güncel gelişmeler. *Sağlık Bilimleri ve Meslekleri Dergisi*, 6(3), 583-594. <https://doi.org/10.5152/hsp.2019.440012>
- Altun, D. (2007). *Usnea longissima ach. likeninin Drosophila melanogasterin çeşitli gelişim parametreleri ve ömür uzunluğu üzerine etkileri* [Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi].
- Andón, F. T., & Fadeel, B. (2013). Programmed cell death: molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 733-742. <https://doi.org/10.1021/ar300020b>
- Aslankoç, R., Demirci, D., Ümmahan, İ. N. A. N., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M. & Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü- Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369. <https://doi.org/10.17343/sdutfd.566969>
- Babaç, M., Ekinci, M., & Derya, İ. Ö. (2023). Kanser Tanısı ve Tedavisinde Kullanılan Monoklonal Antikorlar. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(1), 295-310. <https://doi.org/10.33483/jfpau.1196392>
- Barbaros, M. B., & Dikmen, M. (2015). Kanser immünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31(4), 177-182. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/erciyesfen/issue/25543/269496>
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/522164>
- Bayramova, N., & Karadakovan, A. (2003). Psoriasisli hastaların yaşam kalitesi ve yaşam kalitesini etkileyen faktörlerin incelenmesi. *Hemşirelikte Araştırma Geliştirme Dergisi*, 5(1), 45-52.
- Borgstahl, G. E., Parge, H. E., Hickey, M. J., Johnson, M. J., Boissinot, M., Hallewell, R. A., & Tainer, J. A. (1996). Human mitochondrial manganese superoxide dismutase

- polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*, 35(14), 4287-4297. <https://doi.org/10.1021/bi951892w>
- Boyle, P., & Ferlay, J. (2005). Mortality and survival in breast and colorectal cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2(9), 424-425. <https://doi.org/10.1038/ncponc0288>
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhrer, S., & Speit, G. (2005). The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20(4), 245-254. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei033>
- Cailleau, R., Mackay, B., Young, R. K., & Reeves Jr, W. J. (1974). Tissue culture studies on pleural effusions from breast carcinoma patients. *Cancer research*, 34(4), 801-809.
- Cansaran, D., Çetin, D., Halıcı, M. G., & Atakol, O. (2006). Determination of usnic acid in some Rhizoplaca species from Middle Anatolia and their antimicrobial activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(1-2), 47-51. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-1-209>
- Ceconi, C., Boraso, A., Cargnoni, A., & Ferrari, R. (2003). Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 420(2), 217-221. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.06.002>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1091>
- Cleeland, C. S. (2007). Symptom burden: multiple symptoms and their impact as patient-reported outcomes. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 2007(37), 16-21. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgm005>
- Colditz, G. A., & Bohlke, K. (2014). Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 64(3), 186-194. <https://doi.org/10.3322/caac.21225>
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249-261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Cormerais, Y., Giuliano, S., LeFloch, R., Front, B., Durivault, J., Tambutté, E., & Pouyssegur, J. (2016). Genetic disruption of the multifunctional CD98/LAT1 complex demonstrates the key role of essential amino acid transport in the control

- of mTORC1 and tumor growth. *Cancer Research*, 76(15), 4481-4492.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3376>
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, 5(10), 2929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124964>
- Dar, T. U. H., Dar, S. A., Islam, S. U., Mangral, Z. A., Dar, R., Singh, B. P., & Haque, S. (2022, November). Lichens as a repository of bioactive compounds: an open window for green therapy against diverse cancers. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 86, pp. 1120-1137). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.05.028>
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316-328.  
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
- Dikilitaş, M., & Koçyiğit, A. (2010). Mononuclear leukocyte DNA damage on higher cells caused by eco-friendly pesticides and their analysis using CASP® programme. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 14(4), 47-56.  
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/harranziraat/issue/18433/194178>
- Dinçer, Y., & Kankaya, S. (2010). DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30(4), 1365-73.  
<https://doi.org/10.5336/medsci.2009-15258>
- Draper, H. H. (1990). Nutritional modulation of oxygen radical pathology. *Advances in Nutritional Research*, 119-145. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0611-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0611-5_6)
- Driessens, G., Kline, J., & Gajewski, T. F. (2009). Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunological Reviews*, 229(1), 126-144.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00771.x>
- Erenel, G., Erbaş, D., & Arıcıoğlu, A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Medical Journal*, 3(4), 137-142.  
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/vansaglik/issue/50116/643413>
- Erkekoğlu, P., & Baydar, T. (2021). Güncel *in vitro* sitotoksosite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.  
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/hujpharm/issue/60867/729993>

- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O. A., Baltacı, D., Oktay, M., & Çolakoğlu, S. (2012). Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Duzce Medical Journal*, 14(2), 87-101. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/dtfd/issue/48283/611290>
- Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381), 1317-1322. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1317>
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., & Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 7(1), 21-33. <https://doi.org/10.1038/nrg1748>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fidan, A. F. (2005). DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/akufemubid/issue/1607/20025>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907-1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- 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. <https://doi.org/10.1081/DMR-100102335>
- Foley, K. P., & Eisenman, R. N. (1999). Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1423(3), M37-M47. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(99\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(99)00012-8)
- Gichner, T., Menke, M., Stavreva, D. A., & Schubert, I. (2000). Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the Comet assay in tobacco and field beans. *Mutagenesis*, 15(5), 385-389. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.5.385>
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>

- Goodsell, D. S. (2004). Catalase. *RCSB Protein Data Bank*.  
[https://doi.org/10.2210/rcsb\\_pdb/mom\\_2004\\_9](https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2004_9)
- Grabacka, M. M., Gawin, M., & Pierzchalska, M. (2014). Phytochemical modulators of mitochondria: The search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. *Pharmaceuticals*, 7(9), 913-942. <https://doi.org/10.3390/ph7090913>
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>
- Gunasekarana, V., Raj, G. V., & Chand, P. (2015). A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(3), GE01. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12062.5622>
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828.  
<https://doi.org/10.1093/clinchem/41.12.1819>
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S-725S.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical Reviews*, 116(5), 3029-3085.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- Howlader, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A., & Cronin, K. A. (2014). US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(5), dju055.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/dju055>
- Ingolfisdottir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7), 729-736.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69-90.  
<https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., & Thun, M. J. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 59(4), 225-249.  
<https://doi.org/10.3322/caac.20006>

- John, V., Güvenç, Ş., & Türk, A. (2020). Additions to the checklist and bibliography of the lichens and lichenicolous fungi of Turkey. *Archive for lichenology*, 19, 1-32.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76. <https://doi.org/10.24880/maevfd.260790>
- Kenny, P. A., Lee, G. Y., Myers, C. A., Neve, R. M., Semeiks, J. R., Spellman, P. T., & Bissell, M. J. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology*, 1(1), 84-96. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Key, T. J., Verkasalo, P. K., & Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology*, 2(3), 133-140. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00254-0)
- Kilinc, F., Guvel, S., Kayaselcuk, F., Aygun, C., Egilmez, T., & Ozkardes, H. (2004). p53 expression and apoptosis in varicocele in the rat testis. *The Journal of Urology*, 172(6), 2475-2478. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000138471.35553.ce>
- Kireççi, O. A. (2018). Bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), 473-483. <https://doi.org/10.17798/bitlisfen.463251>
- Koppen, G., Azqueta, A., Pourrut, B., Brunborg, G., Collins, A. R., & Langie, S. A. (2017). The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 32(3), 397-408. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex002>
- Kozan, R., & Tokgöz, V. (2016). Türkiye’de meme kanseri farkındalığı ve tarama programı. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4, 185-188. <http://journal.acibadem.edu.tr/tr/pub/issue/61314/914452>
- Kumar, J., Dhar, P., Tayade, A. B., Gupta, D., Chaurasia, O. P., Upreti, D. K., & Srivastava, R. B. (2014). Antioxidant capacities, phenolic profile and cytotoxic effects of saxicolous lichens from trans-Himalayan cold desert of Ladakh. *PloS one*, 9(6), e98696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098696>
- Leavitt, S., Fernández-Mendoza, F., Pérez-Ortega, S., Sohrabi, M., Divakar, P., Lumbsch, T., & Clair, L. S. (2013). DNA barcode identification of lichen-forming fungal species

- in the *Rhizoplaca melanophthalma* species-complex (Lecanorales, Lecanoraceae), including five new species. *MycoKeys*, 7, 1-22. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.7.4508>
- Levit, L., Balogh, E., Nass, S., & Ganz, P. A. (2013). Patient-centered communication and shared decision making. In *Delivering high-quality cancer care: Charting a new course for a system in crisis*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/18359>
- Li, Y., Li, S., Meng, X., Gan, R. Y., Zhang, J. J., & Li, H. B. (2017). Dietary natural products for prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients*, 9(7), 728. <https://doi.org/10.3390/nu9070728>
- MacMahon, B., Cole, P., & Brown, J. (1973). Etiology of human breast cancer: a review. *Journal of the National Cancer Institute*, 50(1), 21-42. <https://doi.org/10.1093/jnci/50.1.21>
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., Ovando, H. G., Weyers, A., Ugnia, L., & Gorla, N. (2009). Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(1), 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.02.001>
- Mccord, J. M. (1993). Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry*, 26(5), 351-357. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(93\)90111-I](https://doi.org/10.1016/0009-9120(93)90111-I)
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>
- Moses, H. L., Yang, E. Y., & Pietenpol, J. A. (1990). TGF- $\beta$  stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 63(2), 245-247. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90155-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90155-8)
- Muthukumar, K., & Nachiappan, V. (2010). Cadmium-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 47(6), 383-387.
- Müller, K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 9-16. <https://doi.org/10.1007/s002530100684>

- Odabaşoğlu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., & Kazaz, C. (2006). Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.043>
- Oksanen, I. (2006). Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 723-734. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0611-3>
- Oropesa, A. L., García-Camero, J. P., & Soler, F. (2009). Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(1), 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.08.003>
- Öncel, M. (2012). Isı şok proteinleri ve kanser. *Eur J Basic Med Sci*, 2(1), 16-23. <https://doi.org/10.21601/ejbms/9171>
- Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A. B., Taghidizaj, A. A., Derici, K., Yılmaz, E., & Cansaran-Duman, D. (2013). Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70(4), 215-26. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1871342>
- Parkin, D. M. (2006). The evolution of the population-based cancer registry. *Nature Reviews Cancer*, 6(8), 603-612. <https://doi.org/10.1038/nrc1948>
- Pilleron, S., Soto-Perez-de-Celis, E., Vignat, J., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Bray, F., & Sarfati, D. (2021). Estimated global cancer incidence in the oldest adults in 2018 and projections to 2050. *International Journal of Cancer*, 148(3), 601-608. <https://doi.org/10.1002/ijc.33232>
- Romagni, J. G., & Dayan, F. E. (2002). Structural diversity of lichen metabolites and their potential use. In *Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation* (pp. 151-169). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4439-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4439-2_11)
- Samur, M., Şenler, F. Ç., Akbulut, H., Pamir, A., & Arıcan, A. (2000). Kanser tanısı almış hastaların bilgilendirilme durumu: hekim ve hekim adaylarının yaklaşımları hakkında ankara üniversitesi tıp fakültesi ibni sina hastanesi'nde yapılan sınırlı bir araştırmanın sonuçları. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 53(3), 161-166. [https://doi.org/10.1501/Tipfak\\_0000000304](https://doi.org/10.1501/Tipfak_0000000304)

- Sanyal, J., Bandyopadhyay, S. K., Banerjee, T. K., Mukherjee, S. C., Chakraborty, D. P., Ray, B. C., & Rao, V. R. (2009). Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 13(2), 129-132. <https://www.europeanreview.org/article/608>
- Sav, A., King, M. A., Whitty, J. A., Kendall, E., McMillan, S. S., Kelly, F., & Wheeler, A. J. (2015). Burden of treatment for chronic illness: a concept analysis and review of the literature. *Health Expectations*, 18(3), 312-324. <https://doi.org/10.1111/hex.12046>
- Ścibior, D., & Czczot, H. (2006). Catalase: structure, properties, functions. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 60, 170-180.
- Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G., & Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics*, 9(5), 311-320. <https://cgp.iijournals.org/content/9/5/311.abstract>
- Sert, P. İ., & Küçükkılınç, Z. T. T. (2022). Meme Kanseri Tedavisindeki Güncel Yaklaşımlar. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 42(1), 46-59. <https://doi.org/10.52794/hujpharm.959879>
- Sevgi, O., & Tecimen, H. B. (2012). Bazı Liken Terimlerinin Türkçe Karşılıkları. *Liken Araştırmaları Derneği (LİKAD) Bülteni*, 1, 11-15.
- Shrestha, G., El-Naggar, A. M., St. Clair, L. L., & O'Neill, K. L. (2015). Anticancer activities of selected species of North American lichen extracts. *Phytotherapy Research*, 29(1), 100-107. <https://doi.org/10.1002/ptr.5233>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Singh, N., Nambiar, D., Kale, R. K., & Singh, R. P. (2013). Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutrition and Cancer*, 65(sup1), 36-43. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.785007>
- Sloof, J. E. (1993). Environmental lichenology: biomonitoring trace-element air pollution [Doctoral thesis, Technische Hogeschool Delft].
- Smigal, C., Jemal, A., Ward, E., Cokkinides, V., Smith, R., Howe, H. L., & Thun, M. (2006). Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 56(3), 168-183. <https://doi.org/10.3322/canjclin.56.3.168>

- Söylemez, E., Kayaaltı, Z., Aliyev, V., & Söylemezoğlu, T. (2012). Effect of cigarette smoking on DNA damage according to nine comet assay parameters in female and male groups. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 65(1), 39-46. [https://doi.org/10.1501/Tipfak\\_0000000805](https://doi.org/10.1501/Tipfak_0000000805)
- Topal, T., Öter, S., & Korkmaz, A. (2009). Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19(3), 137-143.
- Tozan-Beceran, A., Omurtag, G. Z., Yeğen, C., & Şardaş, S. (2011). Kolorektal kanser tanısı konmuş olgularda ve birinci derece yakınlarında DNA hasarının araştırılması. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 1(3), 155-161. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/clinexphealthsci/issue/17846/187147>
- Tyler, G. (1989). Uptake, retention and toxicity of heavy metals in L ichens: A brief review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 47, 321-333. <https://doi.org/10.1007/BF00279330>
- Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
- Williams, G. M. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, 166(1-2), 3-10. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00442-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00442-5)
- Willingham, D. B. (1999). The neural basis of motor-skill learning. *Current Directions in Psychological Science*, 8(6), 178-182. <https://doi.org/10.1111/1467-8721.00042>
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 151, 1-32. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*, 25(2), 85-101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>

- Yang, Y., Park, S. Y., Nguyen, T. T., Yu, Y. H., Nguyen, T. V., Sun, E. G., & Kim, H. (2015). Lichen secondary metabolite, physciosporin, inhibits lung cancer cell motility. *PloS one*, 10(9), e0137889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137889>
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
- Yurdacan, B., Egeli, U., Eskiler, G. G., Eryilmaz, I. E., Cecener, G., & Tunca, B. N. (2019). The role of usnic acid-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma. *Human & Experimental Toxicology*, 38(2), 201-215. <https://doi.org/10.1177/0960327118792052>
- Zambare, V. P., & Christopher, L. P. (2012). Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50(6), 778-798. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.633089>
- Zhou, Z., Sun, X., & Kang, Y. J. (2001). Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas-and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *The American Journal of Pathology*, 159(1), 329-338. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61699-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61699-9)
- Ziech, D., Anastopoulos, I., Hanafi, R., Voulgaridou, G. P., Franco, R., Georgakilas, A. G., & Panayiotidis, M. I. (2012). Pleiotropic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. *Cancer Letters*, 327(1-2), 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.025>