

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MELANOM KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE USNİK ASİTİN APOPTOTİK
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Burcu Pelin BÜYÜK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

MELANOM KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE USNİK ASİTİN APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Burcu Pelin BÜYÜK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Türker DUMAN

Cilt kanseri cildi etkileyen bir kanser türüdür. En ölümcül cilt kanseri türlerinden biri olan melanom dünyadaki ölümlerin %4' üne sebep olmaktadır. Antibiyotiklerin keşfini ve insan sağlığına temel katkılarını yakından takip eden bilim dünyası, patojenik mikroplara karşı aktivitesi olan yeni aktif maddelerin arayışındadır. Likenlerde bu öncü çalışmalara konu olmuştur. Liken aktif maddeleri arasında usnik asit birçok bilim insanının ilgisini çekmiştir ve özel bir liken sekonder metaboliti olarak görülmektedir. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında liken sekonder metabolitlerinden usnik asitin insan melanosit hücre hattı (NHEM-Ad) ve malign melanom hücre hattı (A-375) kullanılmak suretiyle apoptoz yolağı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve çeşitli moleküler ve biyokimyasal yaklaşımlar ile uzun vadede kanser tedavisinde kullanılabilirliğinin in vitro düzeyde araştırılması hedeflenmiştir. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi aracılığıyla usnik asitin normal insan melanosit hücre hattı ve malign melanom hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi tayin edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında insan melanosit hücre hattı (NHEM-Ad) için IC_{50} değeri $3.47 \mu M$, malign melanom hücre hattı (A-375) için ise $20 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. Apoptoz ile ilgili 84 adet genin kontrol ve uygulama grubu arasında sergiledikleri değişen ifade profilleri ve Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 enzim aktivitesi testlerinden elde edilen sonuçlar, usnik asitin insan malign melanom hücre hattında apoptozu indüklemek suretiyle anti-kanser etki sergileyebileceğini göstermiştir. Bu etkinin apoptozun hem dışsal hem de içsel yolağı üzerinden geliştiği fakat mRNA profiline göre değerlendirdiğimizde daha baskın olarak dışsal yolağın kullanıldığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen çıktıların cilt kanseri tedavisinde usnik asitin ilaç aday molekülü olarak kullanılabileceğine işaret ettiği düşünülmektedir. Elde edilen bulguların diğer araştırmacılar için de önemli bir kaynak teşkil etmesi umudunu taşımaktayız. Usnik asitin topikal veya transdermal uygulamalar şeklinde ilaç olarak kullanımının ileride cilt kanseri tedavisinde önemli potansiyel taşıyabileceğine inanmaktayız.

Şubat 2022, 122 sayfa

Anahtar Kelimeler: Melanom cilt kanseri, Usnik Asit, Apoptoz, qRT-PCR

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE APOPTOTIC EFFECT OF VULPINIC ACID ON THE MELANOMA CANCER CELL

Burcu Pelin BÜYÜK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Türker DUMAN

Skin cancer is a type of cancer that affects the skin. Melanoma, is the most harmful type of skin cancer, causes 4% of deaths in the world. The scientific world, which closely follows the discovery of antibiotics and their fundamental contribution to human health, is in search of new active substances with activity against pathogenic microbes. Lichens have been the subject of these pioneering studies. Among the lichen active substances, usnic acid has attracted the attention of many scientists and is considered as a special lichen secondary metabolite. In this thesis, it was aimed to evaluate the effects of usnic acid, one of the secondary metabolites of lichen, on the apoptosis pathway by using human melanocyte cell line (NHEM-Ad) and malignant melanoma cell line (A-375), and to investigate its use in cancer treatment in vitro with various molecular and biochemical approaches. The antiproliferative effect of usnic acid on normal human melanocyte cell line and malignant melanoma cell line was determined by xCELLigence real-time cell analysis system. In the light of the data obtained, the IC₅₀ value was calculated as 3.47 μ M for the human melanocyte cell line (NHEM-Ad) and 20 μ M for the malignant melanoma cell line (A-375). The varying expression profiles of 84 genes related to apoptosis between the control and treatment groups and the results obtained from Caspase-3 and Caspase-9 enzyme activity tests showed that usnic acid can exhibit anti-cancer effects by inducing apoptosis in human malignant melanoma cell line. It was found that this effect developed through both the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis, but when we evaluated it according to the mRNA profile, the extrinsic pathway was more dominant. It is thought that the results obtained from this study indicate that usnic acid can be used as a drug candidate molecule in the treatment of skin cancer. We hope that the findings obtained will be an important resource for other researchers. We believe that the use of usnic acid as a drug in the form of topical or transdermal applications may have significant potential in the treatment of skin cancer in the future.

February 2022, 122 pages

Key words: Melanoma skin cancer, Usnic Acid, Apoptosis, qRT-PCR

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi boyunca ve bu çalışmanın yürütülmesinde her konuda bilgi ve tecrübelerini esirgemedi paylaşan ve desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Türker DUMAN'a,

Tez deney süreçlerinin yürütülmesinde her zaman maddi manevi destek sunarak beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan başta Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı DUMAN LAB sorumlusu Sayın Prof. Dr. Demet Cansaran DUMAN ve Ankara Üniversitesi BMBL LAB sorumlusu Sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS hocalarım olmak üzere tüm laboratuvar ekip arkadaşlarıma,

Tez projesi kapsamında, 'FDK-2022-2498' proje numarasıyla sağladıkları destek nedeniyle Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Bu yoğun ve zorlu süreçte hayatımın her aşamasında olduğu gibi her zaman yanımda ve bana destek olan değerli eşim İlker BÜYÜK'e, oğullarım Kerem Sarp BÜYÜK ve Batu Alp BÜYÜK'e sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Burcu Pelin BÜYÜK
Ankara, Şubat 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Kanser	3
2.1.1 Kanserin gelişimi.....	4
2.1.2 Kanserin sebepleri.....	6
2.1.3 Kanser hücrelerinin özellikleri	8
2.2 Cilt Kanseri ve Sınıflandırılması	13
2.2.1 Melanom epidemiyolojisi ve patogenezi.....	16
2.2.1.1 Cilt tipi ve nevüs sayısı.....	23
2.3 İlaç Aday Molekülü: Usnik asit	25
2.3.1 Usnik asitin anti-tümör etkilerine genel bir bakış	27
2.4 Hücre Ölüm Mekanizmaları	32
2.4.1 Tip I hücre ölümü – Apoptozis	33
2.4.1.1 Apoptozdaki morfolojik değişiklikler	34
2.4.1.2 Apoptozdaki biyokimyasal modifikasyonlar	35
2.4.1.3 Apoptoz mekanizmaları	36
2.4.1.4 Ekstrinsik (dışsal) ölüm reseptörü yolu	37
2.4.1.5 İntrinsik mitokondriyal yol	38
2.4.1.6 Ortak yol	38
2.4.1.7 İntrinsik endoplazmik retikulum yolu	39
2.4.1.8 Pro-apoptotik / anti-apoptotik proteinlerin bozulması	40
2.4.1.9 Bcl-2 protein ailesi.....	40
2.4.1.10 p53 tümör proteini	40
2.4.1.11 Apoptoz proteinlerin inhibitörleri (IAP'ler).....	41
2.4.1.12 Azaltılmış kaspaz aktivitesi	42
2.4.1.13 Bozulmuş ölüm reseptörü sinyali.....	42
2.4.1.14 Apoptozun kanserdeki rolü	43
2.4.2 Tip II hücre ölümü – Otofaji.....	45
2.4.3 Tip III hücre ölümü – Nekrosis	47
2.4.4 Tip IV hücre ölümü – Entozis	49
2.4.5. Atipik hücre ölümü - Mitotik ölüm, paraptosis, piroptosis	50
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	53
3.1 Materyal	53
3.1.1 Kimyasal malzemeler.....	53
3.1.2 Sarf malzemeler.....	53
3.1.3 Kitler.....	53
3.1.4 Cihazlar	54

3.2 Yöntem	54
3.2.1 Hücre kültürü idamesi.....	55
3.2.1.1 Hücrelerin büyüme şartları.....	55
3.2.1.2 Hücre açılması ve besiyerinin değiştirilmesi.....	56
3.2.1.3 Hücre pasajlanması.....	56
3.2.1.4 Hücre dondurulma ve saklanması.....	57
3.2.1.5 Hücre sayımı.....	57
3.2.2 Usnik asitin hazırlanması	58
3.2.3 xCELLigence RTCA ile hücre anti-proliferasyonunun belirlenmesi	58
3.2.4 Hücre görüntüleme	59
3.2.5 Apoptotik etkinin enzim seviyesinde belirlenmesi	59
3.2.5.1 Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi.....	59
3.2.5.2 Kaspaz-9 aktivitesinin belirlenmesi.....	61
3.2.6 Apoptotik etkinin mRNA seviyesinde belirlenmesi	62
3.2.6.1 RNA izolasyonu	62
3.2.6.2 cDNA sentezi.....	63
3.2.6.3 qRT-PCR ile transkript ifade düzeyinin analizi	63
3.2.7 İstatistiksel analiz.....	64
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	65
4.1 Usnik Asitin Melanosit Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	65
4.2 Usnik Asitin Anti-proliferatif Etkisinin Belirlenmesi	66
4.3 Hücre Görüntüleme	67
4.4 Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	69
4.5 Apoptoz Yolağındaki Genlerin mRNA Seviyelerinin Tespiti	70
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	84
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ.....	119

SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece

Kısaltmalar

BCC	Bazal hücreli karsinom
BSA	Sığır Serum Albümini
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Ortamı
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal Sığır Serum
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
MGM-4	Melanosit Büyüme Besiyeri-4
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
qRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCC	Skvamöz hücreli karsinom
UV	Ultraviyole
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Dünya Standart Nüfusuna göre (100.000 nüfusta) ülkemizde en sık meydana gelen ilk on kanser çeşidinin cinsiyete göre insidansı.	4
Şekil 2.2 Kanser klonal evrim modelleri.....	5
Şekil 2.3 Normal hücrelerin kansere dönüşümü	6
Şekil 2.4 Bazı kanserojenlerin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.5 Yoğunluğa bağlı inhibisyon.	9
Şekil 2.6 Hayvan hücre döngülerinin büyüme faktörleri tarafından düzenlenmesi.....	10
Şekil 2.7 Kanserın adım adım ilerlemesi ve büyüme faktörlerinin rolleri.....	11
Şekil 2.8 Cilt kanseri, cildin dış tabakasını (epidermis) oluşturan hücrelerde başlar.	16
Şekil 2.9 Malign melanom; düzensiz kenarlı ve alacalı pigmentli asimetrik lezyona sahiptir	18
Şekil 2.10 Dermoskopi görüntüsü; lezyonun çevresinde yayılan çizgilerle düzensiz geniş pigment ağı.....	18
Şekil 2.11 Lentigo maligna; düzensiz kenarlı - düzensiz pigmentli yama.....	19
Şekil 2.12 Lentigo maligna melanom bölgesinde pigmentsiz eritematöz telanjiektatik nodül	19
Şekil 2.13 (a) Seboreik keratozun klinik görünümü (b) Dermoskopi görüntüsü — serebriform görünüm ve pigment ağı eksikliği.....	20
Şekil 2.14 (a) Başparmağın tabanında gevrek vasküler nodül b) yakından görüntü	21
Şekil 2.15 İyi huylu melanositik nevus. Düzenli, simetrik ve düzgün pigmentli lezyon	21
Şekil 2.16 Displastik nevus; düzensiz şekilli koyu pigmentli nevus. 'Çirkin ördek yavrusu.'	22
Şekil 2.17 (a)-vasküler görünüme sahip kiraz anjiyomunun klinik görüntüsü (b) Dermoskopik görüntü — vasküler lagünler	22
Şekil 2.18 (a) + (b) — Pigmentli bazal hücreli karsinom. İnci telanjiektik nodüller.....	23
Şekil 2.19 (–) usnik asit ve (+) usnik asit enantiyomerlerinin yapısı.....	25
Şekil 2.20 Morfolojik olarak ayırt edilebilen hücre ölümü türlerinin basitleştirilmiş gösterimi.	33
Şekil 2.21 Apoptozun içsel ve dışsal yolları	36
Şekil 2.22 Apoptoz ve karsinogenezden kaçınmaya katkıda bulunan hücresel mekanizmalar.....	43
Şekil 2.23 Otofaji türleri ve kargo seçiciliği.	47
Şekil 2.24 Nekrozda gerçekleşen yapısal değişiklikler.....	49
Şekil 2.25 Hücrede entozis ile meydana gelebilen farklı sonuçlar	50
Şekil 3.1 Çalışmada takip edilen iş akışı özeti.....	55
Şekil 3.2 xCELLigence RTCA S16 cihazı.....	59
Şekil 4.1 Usnik asit ile (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0 ve 50.0 µM) muamele edilen insan melanosit hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre indeks grafiği	65
Şekil 4.2 Usnik asit muamele edilen insan melanosit hücre konsantrasyonlarının logaritmasına bağlı normalize edilmiş hücre indeksi	66
Şekil 4.3 Usnik asit ile (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0 ve 50.0 µM) muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre indeks grafiği	66

Şekil 4.4 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücre konsantrasyonlarının logaritmasına bağlı normalize edilmiş hücre indeksi.....	67
Şekil 4.5 Malign melanom hücreleri (A-375) ve melanosit hücrelerinin UA uygulaması öncesi ve sonrası invert mikroskop altındaki morfolojileri	68
Şekil 4.6 Usnik asit ile muamele edilen A-375 malign melanom ve kontrol olarak kullanılan melanosit hücre hattında Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 enzimlerinin % aktivitesi	69
Şekil 4.7 Test ve kontrol grubu arasında ifadesi artan veya azalan genlerin sayısının gösterildiği saçılım diyagramı (scatter plot).....	75
Şekil 4.8 Test ve kontrol grubu arasında ifadesi artan veya azalan genlerin belirtildiği Clustergram grafiği.	76
Şekil 4.9 Genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası),	77
Şekil 4.10 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde Kaspaz gen ailesi üyelerinin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi	78
Şekil 4.11 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde diğer pro-apoptotik gen ailesi üyelerinin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi	79
Şekil 4.12 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde ölüm domaini reseptörü kodlayan genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi	80
Şekil 4.13 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağında DNA hasarı ve tamiri ile ilgili genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi.....	80
Şekil 4.14 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağında hücre dışı apoptotik sinyallerden sorumlu genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi	81
Şekil 4.15 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağında anti-apoptotik olarak çalışan genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi.....	82
Şekil 4.16 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağında panel üreticisi tarafından verilen kategorilere dahil edilmemiş olan, apoptoz ile ilişkili diğer bazı genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Melanom teşhisinde kullanılan ABCDE kuralı	17
Çizelge 2.2 Cilt tiplerine ait özellikler ve UVR altında ortaya çıkan eğilimleri.....	24
Çizelge 2.3 Usnik asitin anti-tümör aktivitesi ve ilgili mekanizmaları.....	29
Çizelge 3.1 Tez kapsamında kullanılan hücreler, katalog numaraları ve kullanılan besiyeri içerikleri.....	56
Çizelge 3.2 Kaspaz-3 aktivitesinin 96 kuyulu plakada ölçülmesi için reaksiyon şeması	60
Çizelge 3.3 Kaspaz-9 aktivitesinin ölçülmesi için reaksiyon şeması.....	62
Çizelge 3.4 qRT-PCR kokteyli bileşenleri.....	64
Çizelge 3.5 RT ² Profiler PCR Array için Roche LightCycler 480 cihazında kullanılan PCR döngü koşulları	64
Çizelge 4.1 Apoptoz yolağındaki anahtar genleri içeren RT ² Profiler PCR Array.....	70

1. GİRİŞ

Binlerce yıldır, dünyanın birçok noktasında ve sayısız hastalığın tedavisinde geleneksel bitkisel ilaçlar kullanılmaktadır. Bitkiler birçok ülkede kanser tedavisi içinde bir alternatif oluşturmaktadır. Dünya çapında antikanser özelliklere sahip 3000'den fazla bitki olduğu bilinmektedir (Alves-Silva vd. 2017, Tariq vd. 2017, Yan vd. 2017)

Son yirmi yılda, birçok gelişmiş ülkede tamamlayıcı ve alternatif tıp alanında bitkisel ilaçların kullanımı daha da yaygınlaşmıştır. Doğal ürünler, kanser kemoterapisinde giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Çünkü bunlar biyolojik olarak daha pratik ve normal hücreler için daha az toksik olarak görülmektedir (Mishra ve Tiwari 2011). Ayrıca, doğal ürünlerden türetilen antikanser ilaçların hücre ölümünü teşvik etmek için alternatif yollara sahip olduğuna dair kanıtlar vardır (Khalid vd. 2016). Bu gerçeklere dayanarak, günümüzde birçok araştırma biyolojik organizmaların ilaç endüstrisi için faydalı olabilecek doğal ürünler sağlamadaki potansiyeline odaklanmaktadır (Kotoku vd. 2016, Bernardini vd. 2017).

Günümüzde yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde doğal ürünlerin kullanımı halen taze bir çalışma sahası olarak değerlendirilmektedir. 1940 ve 2014 yılları arasında kanser kemoterapisi için onaylanan küçük moleküllerin yaklaşık %49' unun doğal ürünler olduğu bilinmektedir (Newman ve Cragg 2020).

Likenler, birçok farklı sekonder metabolitler üreten simbiyotik organizmalardır ve bu durum likenleri farmasötik alanı için potansiyel bir kaynak haline getirir (Stanojković 2015). Likenlerde bulunan sekonder metabolitler, anti-enflamatuvar, antiviral, antibakteriyel, analjezik, antipiretik, anti-proliferatif ve sitotoksik olanlar dahil olmak üzere önemli biyolojik ve farmakolojik etkiler gösteren alifatik, sikloalifatik, aromatik ve terpenik bileşikler içerir (Cardile vd. 2017). Bu bileşikler ayrıca, kanser hücrelerine karşı önemli etkiler ortaya koyan prelinik araştırmalarda antineoplastik aktiviteler de göstermiştir (Zhou vd. 2017, Nguyen vd. 2019, Taş vd. 2019).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında liken sekonder metabolitlerinden olan usnik asitin insan malign melanom kanser hücrelerinde (A-375 hücre hattı) anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Usnik asitin sitotoksik ve anti-proliferatif etkisi ise xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile çalışılmıştır. Kolorimetrik kitler aracılığıyla Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür ve apoptoz yolağında anahtar niteliğinde olan 84 adet genin transkripsiyon seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.



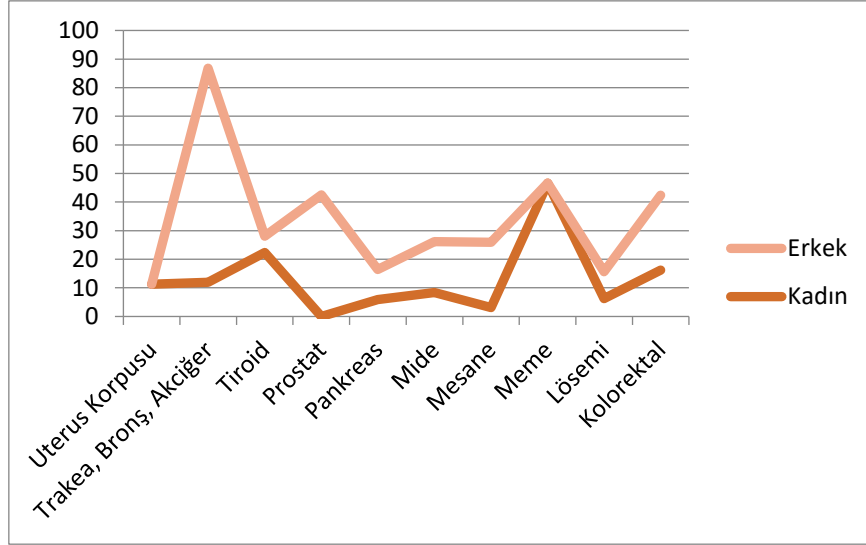
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kanser

Kanser, vücut hücrelerinin herhangi birinin standart dışı proliferasyonu ile meydana gelmektedir. Bu sebepten ötürü kanserli hücrelerin hem davranışları hem de tedaviye yanıtları büyük ölçüde değişebilen yüzden fazla farklı çeşidi bulunmaktadır. Kanser patolojisinde en önemli husus tümörler arasında iyi ve kötü huylu olarak ayırım yapabilmektir (Sharma vd. 2012, Sinha 2018). Yaygın bir cilt sığılı olan iyi huylu bir tümör hem normal dokuyu hem de uzak vücut bölgelerini işgal etmez ve yayılış göstermez. Kötü huylu olarak adlandırılan tümörler ise iyi huylu olanların aksine hem çevredeki normal dokuyu istila edebilir hem de dolaşım ya da lenfatik sistemler yoluyla tüm vücuda yayılabilir, yani metastaz yapabilir. Yalnızca kötü huylu tümörler, kanser olarak adlandırılmaktadır. Dolayısıyla kanseri tehlikeli kılan, istila etme ve yayılma yani metastaz yapma yetenekleridir. Genellikle cerrahi olarak çıkarılabilen iyi huylu tümörlerin aksine kötü huylu tümörler, uzak vücut bölgelerine yayılım göstererek onları tedaviye dirençli hale getirir (Woodhouse vd. 1997, Geiger ve Peeper 2009).

Kanserlerin çoğu karsinomlar, sarkomlar ve lösemiler/lenfomalar olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadır (Masuda vd. 1987, Heidari 2019). Karsinomlar yaklaşık olarak kanserin %90' ını oluşturan epitel hücrelerin maligniteleridir. Tüm malignitelerin yaklaşık olarak %8' ini meydana getiren lenfomalar ve lösemiler ise bağışıklık sistemi ve kan oluşturan hücrelerden meydana gelir. Ender görülen sarkomlar (fibröz doku, kemik, kas ve kıkırdak) ise katı bağ doku tümörleridir (Khavari 2006, Roy vd. 2017, Jiang vd. 2020).

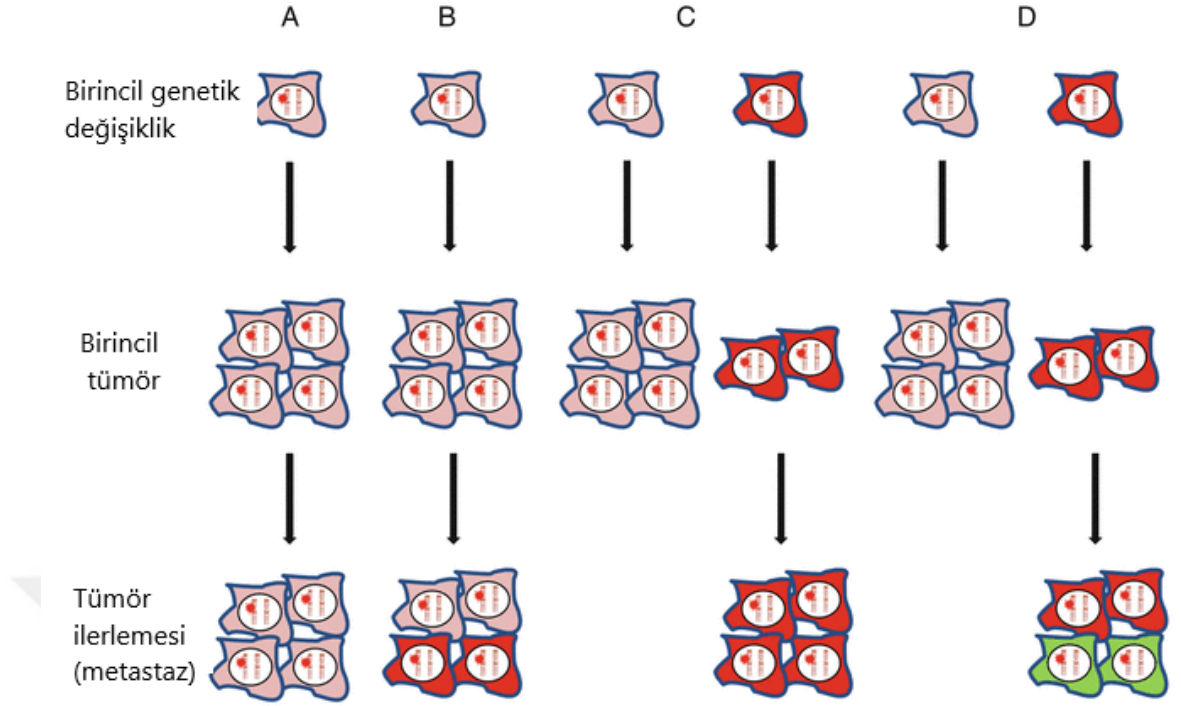
Dünya Sağlık Örgütü tarafından oluşturulan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) 2020 Dünya Kanser İstatistik Verileri'ne göre tahmini olarak küresel çapta melanom dışı cilt kanseri hariç yeni 18,1 milyon vaka ve yaklaşık 9,9 milyon kanser ölümünün meydana geldiği bildirilmiştir (Kransdorf ve Murphey 2006, Hung vd. 2014, Ferlay vd. 2021). Ülkemizde en fazla görülen ilk on kanser çeşidinin cinsiyete göre insidansı şekil 2.1' de verilmiştir.



Şekil 2.1 Dünya Standart Nüfusuna göre (100.000 nüfusta) ülkemizde en sık meydana gelen ilk on kanser çeşidinin cinsiyete göre insidansı Veriler, DSÖ'nün 2020 yılına aittir. Kaynak: GLOBOCAN, IARC 2020

2.1.1 Kanserin gelişimi

Kanserin temel özelliklerinden biri, anormal bir şekilde çoğalarak gelişen tümör klonalitesidir (Şekil 2.2). Tümörün tek hücreli orijini, X kromozomu inaktivasyonu analizi ile gösterilmektedir. X kromozom çiftinin bir üyesi dışı bireylerde heterokromatine dönüştürülerek inaktive edilmektedir (Wainscoat ve Fey 1990, Novelli vd. 2003). X inaktivasyonu, embriyonik gelişim sırasında rastgele meydana gelmektedir (Phelan ve Prchal 2002, Novelli vd. 2003). Normal dokular, farklı inaktif X kromozomlarına sahip hücre karışımlarından oluşmaktadır, bu nedenle heterozigot dişilerin normal dokularında her iki allelin ekspresyonu tespit edilmektedir. Buna karşılık, tümör dokuları genellikle bir heterozigot X kromozomu geninin sadece bir alelini eksprese etmektedir. Bunun anlamı, böyle bir tümörü oluşturan tüm hücrelerin, tümör gelişmeye başlamadan önce X inaktivasyon modelinin sabitlendiği tek bir orijin hücresinden türetildiğidir (Jacobs vd. 1992, Jovanovic vd. 2003, Novelli vd. 2003).



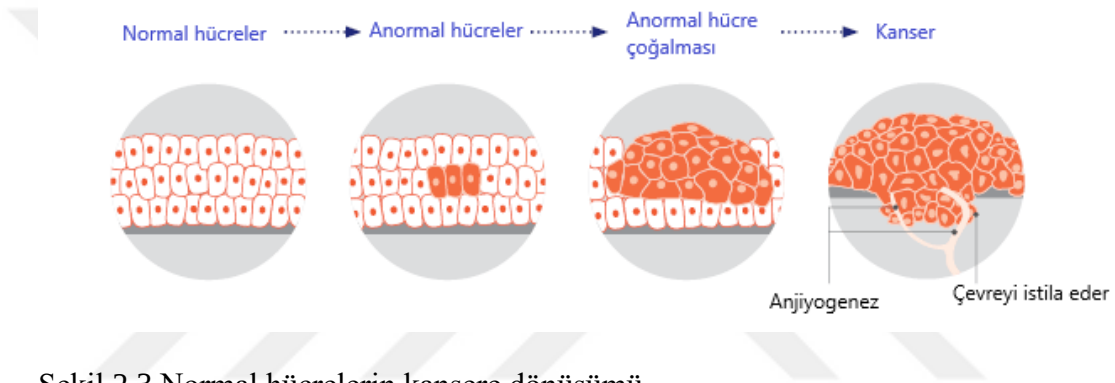
Şekil 2.2 Kanser klonal evrim modelleri

(a) Monoklonal hipotez, kanser hücrelerinin, hastalığın seyri sırasında başka ikincil değişiklikler almadan monoklonal bir orijini koruduğunu öne sürer. (b) İkinci mekanizma, zaman içinde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak bir monoklonal tümörjenez sürecini ve ardından ikincil bir klonal heterojenliği onaylayan klonal sapma kavramına dayanır. (c) Üçüncü model, bir ilk poliklonal tümör oluşumunu ve ardından ikincil bir mono- veya oligoklonalite ile sonuçlanan klonal yakınsamayı içerir. (d) Son model, erken klonal yakınsama ve geç klonal ayrışma ile karakterize edilen bir kanser poliklonal kökeni önermektedir (Fanale vd. 2017).

Kanser gelişimi, bir dizi değişiklik yoluyla hücrelerin yavaş yavaş kötü huylu hale geldiği çok aşamalı bir süreçtir (Kim vd. 2018). Kanser çok aşamalı gelişiminin bir göstergesi, çoğu kanserin yaşamın geç dönemlerinde ortaya çıkmasıdır. Yaşla birlikte kanser insidansındaki artış, kanserin çoklu anormalliklerin bir sonucu olarak geliştiğinin göstergesidir (Baatar vd. 1997, DePinho 2000).

Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, proliferasyon, hayatta kalma, istila ve metastaz yapan hücreler için mutasyon ve seçim içeren çok aşamalı bir ilerleme olarak görülmektedir. İlk basamak olan tümör oluşumu, sadece bir hücrenin uğradığı genetik değişiklik sebebiyle kontrolsüz çoğalma yeteneği kazanmasıyla başlar. Hücre proliferasyonu daha sonra klonal olarak türetilmiş tümör hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasına yol açmaktadır (Şekil 2.3) (Coussens ve Werb 1996, Deshpande vd. 2005,

Klaus ve Birchmeier 2008). Tümör popülasyonunun hücreleri içinde ek mutasyonlar meydana geldikçe tümörün ilerlemesi devam etmektedir. Bu mutasyonların bir kısmı hücreye daha hızlı ve çabuk büyüme gibi birtakım seçici avantajlar sağlar ve böyle bir mutasyonu taşıyan hücreler tümör popülasyonunda baskın hale gelirler. Bu süreç klonal seçim olarak adlandırılır, çünkü tümör hücrelerinin oluşan yeni klonu, büyüme hızında artış veya seçici bir avantaj sağlayan diğer özelliklere (hayatta kalma, istila veya metastaz gibi) bağlı olarak evrimleşmiştir. Klonal seçim, tümörün gelişimi boyunca devam etmektedir. Bu nedenle tümörler sürekli olarak daha hızlı büyür ve giderek daha kötü huylu hale gelirler (Ahmed ve Li 2013, Schulte vd. 2018).



Şekil 2.3 Normal hücrelerin kansere dönüşümü

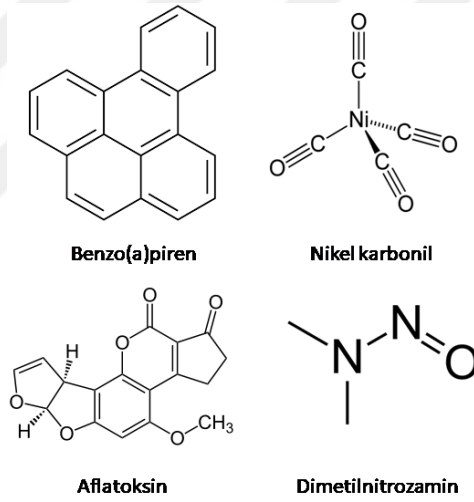
Normalde hücreler kontrollü bir şekilde büyür ve çoğalır, ancak bazen hücreler anormal hale gelir ve büyümeye devam eder. Anormal hücreler, kanser adı verilen bir kitle oluşturabilir (<https://www.cancer.org.au/> adresinden alınarak revize edilmiştir).

2.1.2 Kanserın sebepleri

Kansere neden olan ve kanserojen olarak adlandırılan maddeler, hem deney hayvanlarında yapılan çalışmalarla hem de epidemiyolojik analizlerle (örneğin, sigara içenlerde yüksek akciğer kanseri insidansı) tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi birçok etmenin kansere neden olduğu bulunmuştur (Hakomori 2002, Clarke vd. 2010, Sosnowski vd. 2016).

Radyasyon ve birçok kimyasal kanserojen, DNA'ya zarar vermekte ve mutasyonları indüklemektedir. Hedef genlerdeki mutasyonların indüklenmesinin kanser gelişimine yol açan ilk olay olduğu düşünüldüğünden, kanserojenlere genellikle başlatıcı ajanlar

denilmektedir (Şekil 2.4). İnsan kanserlerine etkisi olan bazı başlatıcı ajanlar arasında güneş ultraviyole radyasyonu (cilt kanserinin başlıca nedeni), tütün dumanındaki kanserojen kimyasallar ve aflatoksin (yanlış depolanmış yer fıstığı ve diğer tahıl kaynaklarını kirleten bazı küfler tarafından üretilen güçlü bir karaciğer kanserojeni) bulunmaktadır. Tütün dumanındaki kanserojenler (benzo(a)piren, dimetilnitrosam ne ve nikel bileşikler dahil) insan kanserinin başlıca tanımlanmış nedenlerindendir. Sigara, ağız boşluğu, farenks, gırtlak, yemek borusu ve diğer bölgelerin kanserleriyle ilişkilendirilmesinin yanı sıra, akciğer kanserlerinin %80 ile %90' ının tartışmasız nedenidir. Kanser kaynaklı can kayıplarının neredeyse 1/3'ünün sigara kullanımı ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Vogelstein ve Kinzler 1993, Penta vd. 2001, Kim ve Kaelin 2004, Adjiri 2017) .



Şekil 2.4 Bazı kanserojenlerin kimyasal yapısı

Bazı kanserojenler, mutasyonları indüklemek yerine hücre proliferasyonunu uyararak kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır ve tümör promotörleri olarak adlandırılmaktadır. Protein kinaz C'yi aktive ederek hücre proliferasyonunu uyarıcı forbol esterler bu duruma iyi bir örnektir (Kieser vd. 1994, Antal vd. 2015, Newton ve Brognard 2017, Newton 2018).

Hormonların, özellikle östrojenler, bazı insan kanserlerinin gelişiminde tümörü desteklediği bilinmektedir. Örneğin aşırı östrojene maruz kalma sonucunda rahim endometriyum hücrelerinin çoğalması bir kadının endometrial kanser geliştirme olasılığını önemli ölçüde artırır. Bu nedenle endometrial kanser riski, yüksek dozlardaki östrojen tedavisi ve uzun süreli postmenopozal östrojen replasman tedavisi ile önemli ölçüde artar. Bu risk, östrojenin endometrial hücre proliferasyonu üzerindeki uyarıcı etkisine karşı koymak için progesteron verilmesiyle en aza indirilmektedir. Bununla birlikte, östrojen ve progesteron kombinasyonları ile yapılan uzun süreli tedaviler ise, meme kanseri riskinde artışa neden olabilmektedir (Key 1995, Liehr ve Jones 2001, Samavat ve Kurzer 2015).

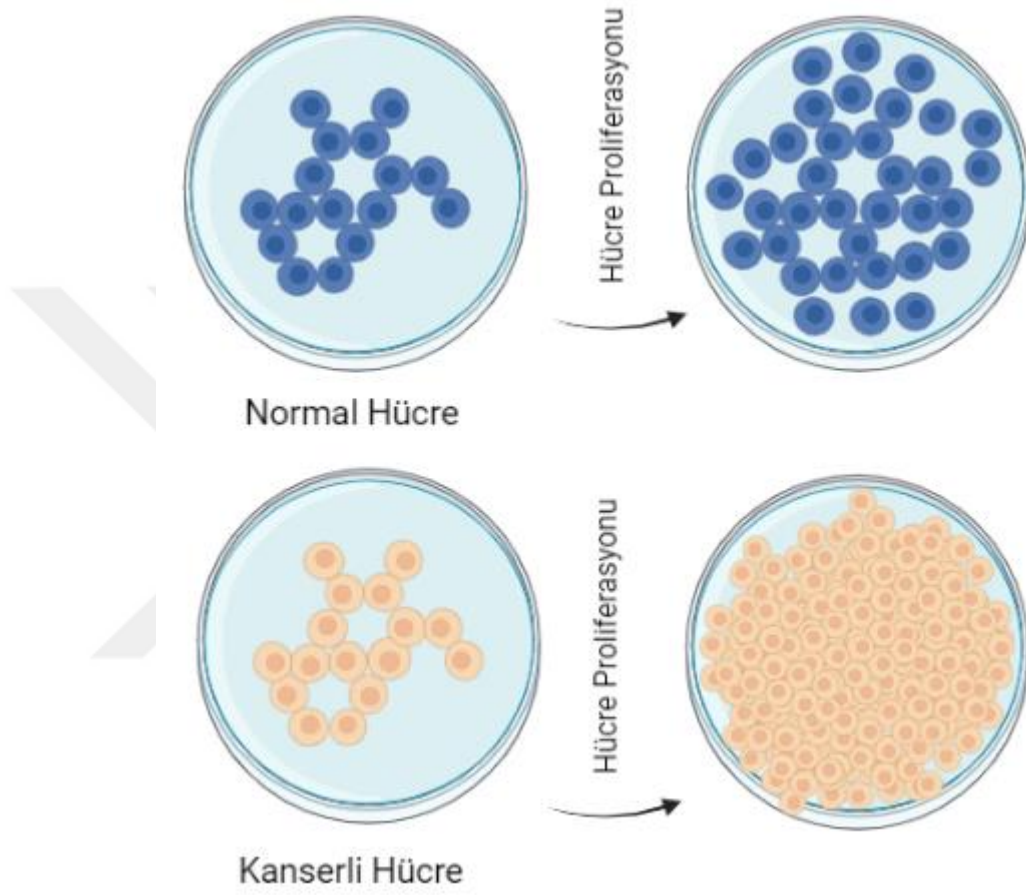
Kimyasallar ve radyasyona ek olarak, bazı virüsler de kansere neden olmaktadır. Virüslerin sıklıkla neden olduğu insan kanserleri karaciğer kanseri ve rahim ağzı kanseridir (Thompson ve Kurzrock 2004, Farrell 2019).

2.1.3 Kanser hücrelerinin özellikleri

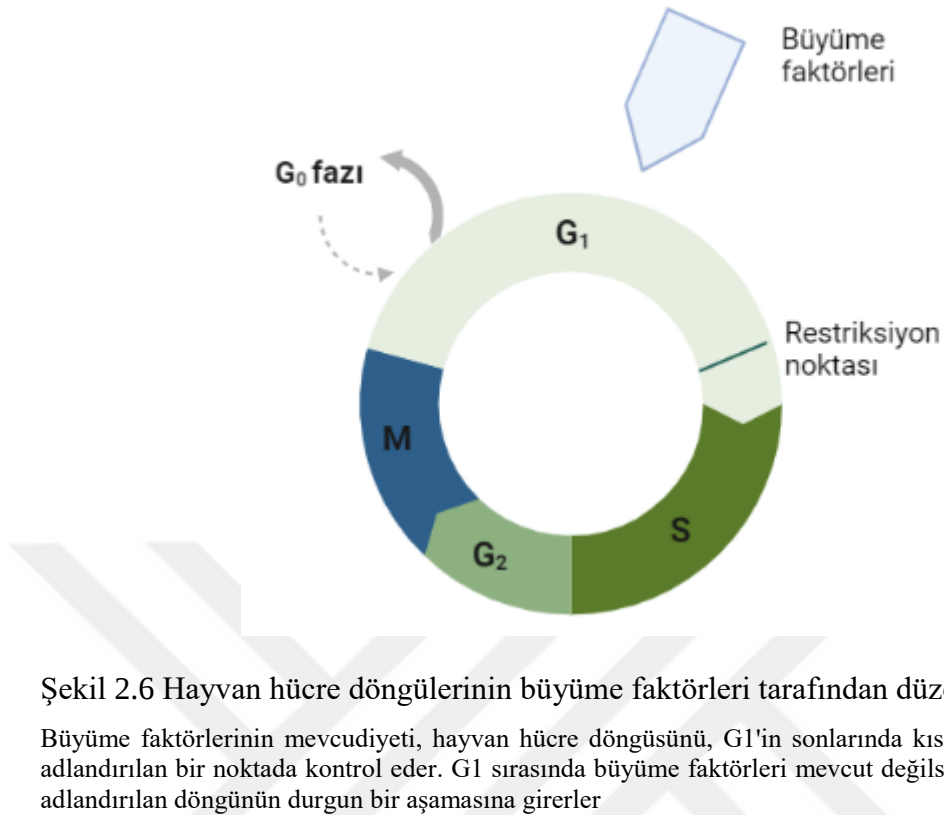
Kanser hücreleri karakteristik olarak normal hücre çoğalması ve farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen ve yöneten mekanizmalarda olağandışı davranışlar sergilemektedir. Birlikte ele alındığında, kanser hücrelerinin bu karakteristik özellikleri, hücresel düzeyde maligniteyi tanımlamaktadır (Sherr 1996, Li ve Neaves 2006, Tse vd. 2012).

Kanser hücrelerinin in vivo kontrolsüz çoğalması, hücre kültüründeki davranışlarıyla izlenebilmektedir. Kültürdeki kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki en temel farklılık, normal hücre proliferasyonunun yoğunluğa bağlı inhibisyon göstermesidir. Normal hücreler, kültür ortamına (genellikle serum şeklinde) eklenen büyüme faktörlerinin mevcudiyeti ile belirlenen bir hücre yoğunluğuna ulaşana kadar çoğalmaktadır. Daha sonra çoğalmayı durdurarak hücre döngüsünün G0 aşamasında tutunur ve hareketsiz hale gelirler. Ayrıca kanser hücrelerinin çoğalması yoğunluğa bağlı inhibisyonundan etkilenmemektedir. Normal hücreler artan hücre yoğunluğuna bağlı proliferasyonun durmasına ve hücrenin G0'a girmesine neden olan sinyallere yanıt

verirken, tümör hücreleri genellikle kültürde yüksek hücre yoğunluklarında dahi büyümeye ve in vivo kontrolsüz çoğalmaya devam ederler (Şekil 2.5-2.6) (Youn vd. 2008, Hatzikirou vd. 2012, Noori ve Hassan 2012).



Şekil 2.5 Yoğunluğa bağlı inhibisyon



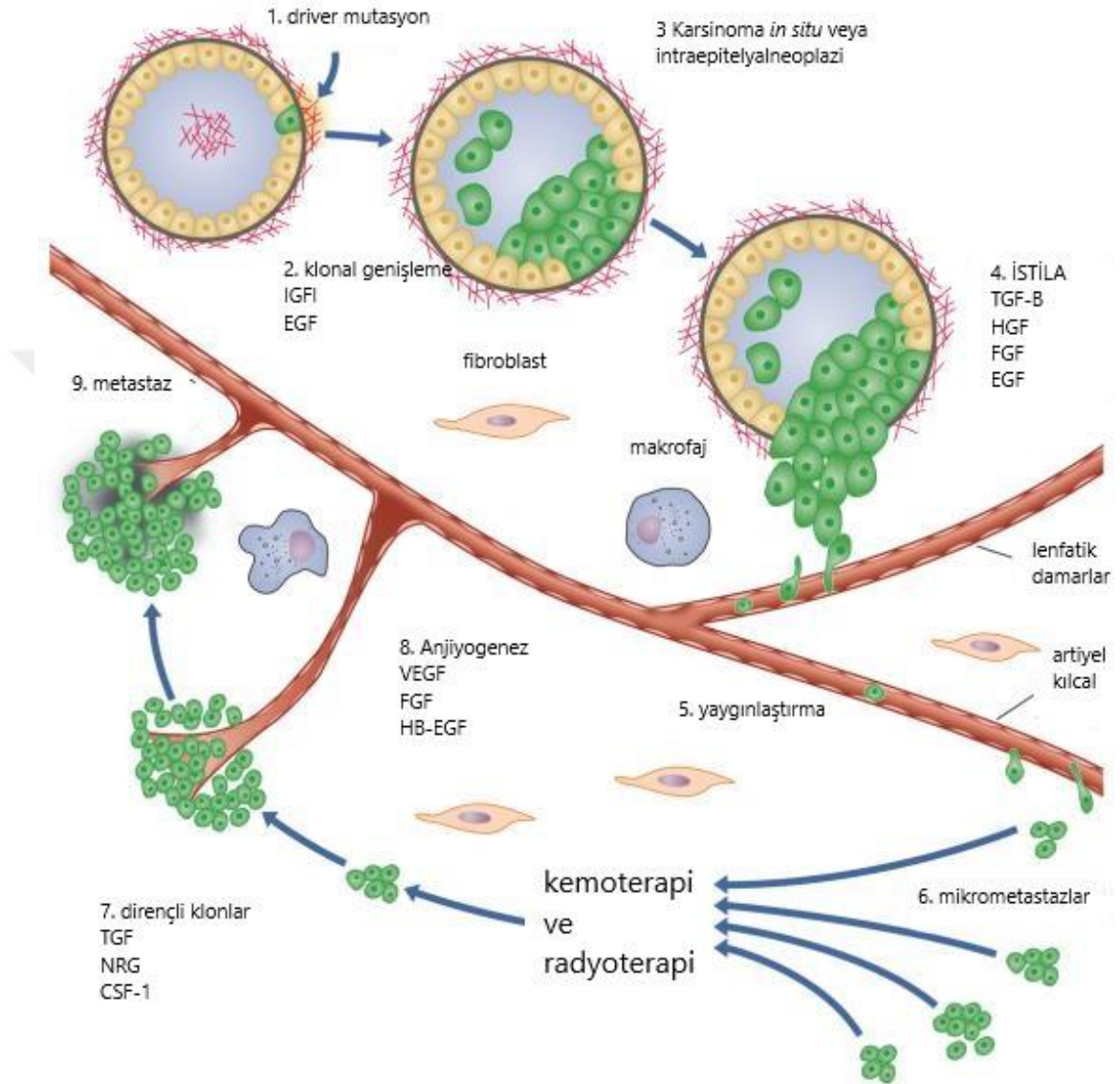
Şekil 2.6 Hayvan hücre döngülerinin büyüme faktörleri tarafından düzenlenmesi

Büyüme faktörlerinin mevcudiyeti, hayvan hücre döngüsünü, G₁'in sonlarında kısıtlama noktası olarak adlandırılan bir noktada kontrol eder. G₁ sırasında büyüme faktörleri mevcut değilse, hücreler G₀ olarak adlandırılan döngünün durgun bir aşamasına girerler

Normal ve kanser hücrelerinin farklarından bir diğeri ise, kanser hücrelerinin hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duymasıdır. Çoğu hücrenin proliferasyonu, büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Bazı hücre tipleri, özellikle fibroblastlar için serumdaki büyüme faktörlerinin mevcudiyeti, hücre kültüründe çoğalma kapasitelerinin temel belirleyicisidir. Normal fibroblastların hareketsiz hale geldiği yoğunluk, kültür ortamındaki büyüme faktörlerinin konsantrasyonu ile orantılı olduğundan, bu hücrelerin büyüme faktörü gereksinimleri yoğunluğa bağlı inhibisyon fenomeni ile yakından ilişkilidir (Kresno ve Gondhowiardjo 2004, Hong vd. 2011, Hu vd. 2019).

Birçok tümör hücresinin büyüme faktörü gereksinimi, normal muadillerine kıyasla daha azdır ve tümör hücrelerinin hem in vitro hem de in vivo olarak düzensiz çoğalmalarına neden olmaktadır. Kanser hücreleri kendi çoğalmalarını uyaran büyüme faktörleri de üretebilmektedir (Şekil 2.7). Bir hücre tarafından büyüme faktörünün bu şekilde anormal üretimi, hücre bölünmesinin (otokrin büyüme uyarımı) sürekli oto-uyarılmasına yol açar. Bu nedenle kanser hücreleri, fizyolojik olarak normal kaynaklardan gelen büyüme

faktörlerine daha az bağımlı hale gelirler (Sporn vd. Roberts 1985, Vignon vd. 1986, Gerlee vd. 2022).



Şekil 2.7 Kanserın adım adım ilerlemesi ve büyüme faktörlerinin rolleri

Süreç, hayatta kalma ve büyüme avantajları sağlayan somatik bir mutasyon tarafından başlatılır (1). EGF ve IGF1 gibi büyüme faktörleri (GF-growth factor), mutasyon taşıyan klonların (2) genişlemesini destekler, bu da genellikle bazal zarla çevrili karsinoma in situ veya intraepitelyal neoplazi gibi intraluminal lezyonlara (3) yol açar. İstila (4), kanser hücrelerinin komşu dokulara göçünü ve penetrasyonunu ifade eder. Kanser hücreleri, uzak organlara yayılmak (5) ve metastaz yapmak için lenfatik ve kan damarlarına girer (ekstravazasyon) ve çıkarlar (intravazasyon). Ortaya çıkan mikrometastazlar (6) genellikle kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılık gösterir. Bununla birlikte, yeni mutasyonların kazanılması ve kanser hücrelerinin büyüme faktörü (otokrin döngüler, kendiliğinden) üretme yeteneği, dirençli klonların aşırı büyümesini teşvik eder (7). Anjiyogenez (8), 1 ml'den büyük sekonder tümörlerin oluşması için esastır. Son aşamada, nispeten büyük metastazlar (9) farklı bir hedef organ grubunu doldurur (Witsch vd. 2010).

Kanser hücrelerinin hücre-hücre ve hücre matriks etkileşimleri normal hücrelere nazaran daha zayıftır. Çoğu kanser hücresi, hücre adezyon moleküllerinin daha az ifade olması sebebiyle, normal hücrelerden daha az yapışkan karakterdedir. Örneğin, epitel hücrelerinin başlıca adezyon molekülü olan E-kadherinin kaybı, karsinomların (epitelyal kanserler) gelişiminde rol oynar. Hücre adezyon moleküllerinin ifadesinin azalışına bağlı olarak, kanser hücreleri diğer hücreler ve doku bileşenleri ile normalden daha fazla etkileşimde bulunurlar ve bu durum malign hücrelerin istila etme ve metastaz yapma yeteneğine katkı sağlar.

Kanser hücrelerinin azalan yapışkanlığı ayrıca hücre morfolojisinde ve hücre iskeletinde değişikliklere neden olur. Birçok tümör hücresi, kısmen hücre dışı matrikse veya komşu hücrelere daha az sıkı tutundukları için normalden daha yuvarlaktır (Lepucki vd. 2022). Normal hücreler ve kanser hücrelerinin gösterdiği hücre-hücre etkileşimlerindeki çarpıcı farklardan biri, temas inhibisyonu fenomeni ile izah edilmektedir. Normal fibroblastlar, komşu bir hücre ile temasa geçene kadar bir kültür kabının yüzeyi boyunca göç etmektedir. Daha sonra bu hücre göçü engellenir. Bu sayede normal hücreler birbirine yapışır ve kültür kabı yüzeyinde düzenli bir hücre dizisi meydana gelir. Tümör hücreleri aksine, komşularıyla temas ettikten sonra hareket etmeye devam eder, bitişik hücreler üzerinde göç eder ve düzensiz, çok katmanlı modellerde büyür (Black 1980, Collins vd. 1997).

Kanser hücrelerinin bitişik normal dokuları istila etmesi için genellikle hücre dışı matriks bileşenlerini sindiren proteaz salgılaması gerekmektedir. Örneğin, kolajenazın salgılanması, karsinomlara sindirme ve altta yatan bağ dokusunu istila etmek için bazal laminalara nüfuz etme yeteneği sağlar. Kanser hücreleri ayrıca, yeni kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) destekleyen büyüme faktörleri salgılar. Bir tümörün büyümesini desteklemek, çoğalan tümör hücrelerine oksijen ve besin sağlamak için yeni kan damarları gerekir. Bu tür kan damarları, tümör hücreleri tarafından salgılanan ve çevreleyen dokudaki kılcal damarların duvarlarındaki endotel hücrelerinin çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerine yanıt olarak oluşturulur ve tümör içine yeni kılcal damarların büyümesine neden olur. Yeni kan damarlarının oluşumu anjyogenez olarak adlandırılır ve tümör büyümesini desteklemesinin yanı sıra metastaz oluşumunda da rol oynar.

Anjiyogenik uyarıya yanıt olarak oluşan aktif olarak büyüyen yeni kılcal damarlar, tümör hücreleri tarafından kolayca nüfuz eder ve kanser hücrelerinin dolaşım sistemine girmesi ve metastatik süreci başlatması için zemin hazırlar. Çoğu kanser hücresinin bir başka genel özelliği, normal olarak farklılaşmamasıdır. Tam olarak farklılaşmış hücrelerin çoğu ya hücre bölünmesini durdurur ya da nadiren bölünür. Kanser hücrelerinde ise, normal farklılaşma programları, aktif çoğalmalarının devam etmesiyle tutarlı olarak, genellikle farklılaşmanın erken bir aşamasında bloke edilir (Papetti ve Herman 2002, Folkman 2003, Özel vd. 2022).

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, kan hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tipinin farklılaşması için çok önemlidir. Birçok kanser hücresi apoptoza girmez ve bu nedenle normal hücrelere kıyasla daha uzun yaşam süreleri sergiler. Kanser hücrelerinin programlanmış hücre ölümünden kaçınmaları, tümör gelişimine büyük katkıda bulunur (Lowe ve Lin 2000). Örneğin, birçok normal hücrenin hayatta kalması, büyüme faktörlerinden veya apoptozu önleyen hücre dışı matristen gelen sinyallere bağlı iken tümör hücreleri, genellikle büyüme faktörlerinin yokluğunda hayatta kalabilir. Normal çevresel sinyallerden yoksun bırakıldığında tümör hücrelerinin apoptoza uğramaması, yalnızca birincil tümör gelişiminde değil, aynı zamanda anormal doku bölgelerinde metastatik hücrelerin hayatta kalması ve büyümesinde de önemli bir etkidir. Normal hücreler DNA hasarını takiben apoptoza uğrarlarken, birçok kanser hücresinde apoptoz görülmemektedir. Anormal hücrelerin sağ kalımı ve proliferasyonu kanser hücrelerinin amansız büyümesinde önemli bir rol oynar (Magalhaes vd. 2017).

2.2 Cilt Kanseri ve Sınıflandırılması

Melanom, bazal hücreli karsinom (BCC) ve skuamöz hücreli karsinom (SCC) olmak üzere üç ana cilt kanseri türü bulunmaktadır. BCC ve SCC melanom dışı cilt kanseri (NMSC) olarak isimlendirilmektedir. Melanom dışı deri kanseri terimi kutanöz lenfoma, adneksiyal tümör, merkel hücreli karsinom (MHK) ve diğer nadir primer kutanöz neoplazmayı kapsamaktadır. Ancak esasen bazal hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinomu tanımlamak için kullanılır. Etiyopatolojileri, klinik seyri ve yönetim

stratejilerindeki açık farklılıklar bu iki karsinomun ortak bir başlık altında gruplandırılmasını zorlaştırmaktadır (Marks 1995, Lallas vd. 2022).

Melanom dışı cilt kanserleri en yaygın insan kanseridir (Diepgen ve Mahler 2002, Hoey vd. 2007). 1960'tan beri dünya çapında melanom dışı cilt kanseri insidansında yıllık %3-8'lik artışlar bildirilmektedir. Sadece bazal hücreli karsinomun insidansı dünya çapında her yıl %10 oranında artmaktadır, bu da bu tümör prevalansının yakında diğer tüm kanserlerin toplamına eşit olacağını düşündürmektedir (Glass ve Hoover 1989). ABD'de tahmini melanom dışı cilt kanseri insidansı yılda 1 milyon vakadan fazladır ve bunların %20-30'u skuamöz hücreli karsinomdur (Madan vd. 2010).

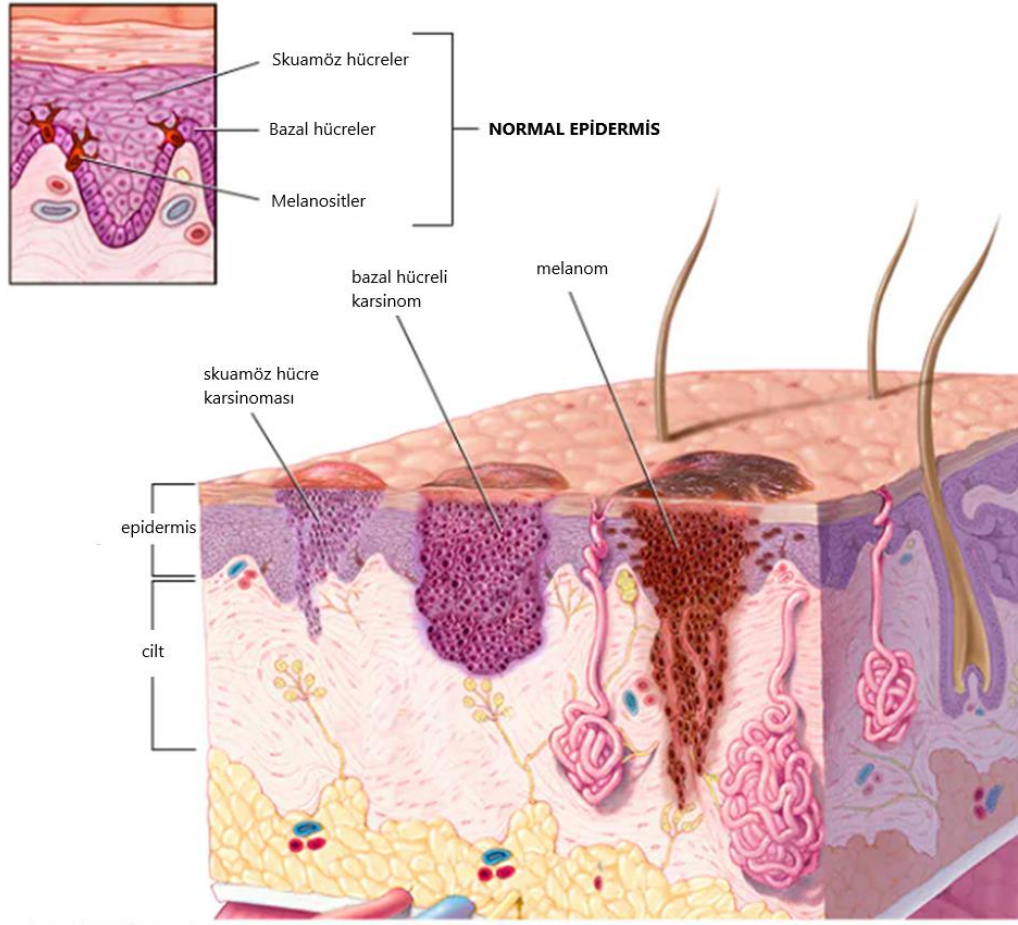
NMSC'ler nispeten öldürücü değildir ve ameliyatla tedavi edilebilir, bu nedenle dünyadaki çoğu kanser kayıtlarında rapor edilmemektedir. Melanom ise en ölümcül cilt kanseridir. İnsidansı (vaka sayısı) NMSC'nin yaklaşık 1/10'u kadardır, ancak ölüm oranı NMSC'den yaklaşık 8 kat daha fazladır. Melanomlar, normalde bazal membranda yer alan ve dendritlerin epidermal keratinositlere uzanan melanositlerden kaynaklanmaktadır (Seebode vd. 2016). Melanositlerin bilinen önemli bir işlevi, lipid membran (melanozomlar olarak adlandırılır) tarafından çevrelenen pigmentler üretmek ve bunları keratinositlere dağıtmak, böylece farklı ten rengi tonları oluşturmaktır.

BCC'ler, epidermin iç bölümünde bulunan hücre tabakasından yani bazal hücrelerden köken alırlar. Bazal hücreler, devamlı çoğaldıkları ayrıca sürekli olarak yüzeye itilen ve sonunda ölü bir stratum corneum tabakası haline gelen keratinositler üretmelerinden dolayı cilt kök hücreleri olarak kabul edilmektedir (Liu-Smith vd. 2017). Skuamöz hücreler, balık pulu şeklini andıran, yani bazal hücrelerden başlayıp skuamöz hücrelere farklılaşan keratinositlerdir. BCC esas olarak güneşe maruz kalan bölgelerde oluşur, %80'i baş ve boyunda ve %15'i gövdede görülmektedir (Rubin vd. 2005). Lezyonlar yavaş büyür, metastaz ise nadir görülür, ancak lezyonlar tedavi edilmezse yerel invazyon ve çevre yapıların yıkımı meydana gelebilir. BCC'nin birkaç histolojik alt tipi vardır. Klasik nodüler alt tip, üzerinde telenjektazi ve yuvarlatılmış kenarlı pembe, inci gibi bir papül olarak ortaya çıkar ve merkezi ülserasyona (kemirgen ülseri) sahip olabilir. Yüzeysel BCC'ler, gövdede daha sık görülen sedef hastalığı, Bowen hastalığı veya

diskoid egzamayı taklit edebilen yavaş büyüyen eritemli plaklardır (Diffey ve Langtry 2005). Morfolojik BCC'ler daha invazivdir ve spesifik olmayan soluk ve plak görünümünden dolayı ancak geç bir aşamada tespit edilebilirler (Diffey ve Langtry 2005). BCC'nin alt tipleri arasında yüksek derecede örtüşme vardır ve en sık rastlanan karışık histolojik tablodur (Katalinic vd. 2003).

SCC, güneşe maruz kalan bölgelerde ülser veya sertleşmiş keratinize lezyonlar olarak ortaya çıkabilir. SCC'ler premalign lezyonlardan, aktinik keratozlardan (AK'ler) ve Bowen hastalığından gelişebilir. AK'ler UV-hasarlı cildin bir belirticidir ve vakaların yaklaşık %1-10'unda invaziv SCC'ye ilerler (Goodwin vd. 2004). Keratoakantomlar tipik olarak nodüler, keratinize edici lezyonlardır ve spontan involüsyonla birkaç ay içinde gelişirler. Histolojik olarak iyi farklılaşmış SCC'lerden ayırt edilemezler ve bu nedenle tüm vakalar için eksizyon esastır.

Bu üç kanser türü (Melanom, BCC ve SCC) birçok ortak özelliği paylaşıyor da yukarıda bahsedildiği gibi etiyoloji ve ilerlemeleri açısından oldukça farklıdır (Şekil 2.8). Cilt kanserinin ortak bir özelliği, mevcut görüntüye göre hepsinin güneş veya yapay ultraviyole radyasyondan (UVR) kaynaklanmasıdır. Güneş UVR'sinden gelen UVA ve UVB, dünya yüzeyine ulaşabilen başlıca UV ışınlarıdır. Her iki UV türü de cilt karsinogenezinde önemli rol oynayan DNA hasarına ve bağışıklık baskılanmasına neden olmaktadır. UVB, DNA molekülleri tarafından doğrudan emilebilir ve DNA hasarlarına sebebiyet verebilir. UVA ise hücrel ROS'u indükleyerek işlev görebilir ve bu da daha sonra oksidatif DNA hasarlarına neden olur (Huang vd. 2009).



Şekil 2.8 Cilt kanseri, cildin dış tabakasını (epidermis) oluşturan hücrelerde başlar

Bazal hücreli karsinom, yaşlı hücreleri sürekli olarak yüzeye doğru iten cilt hücrelerini oluşturan bazal hücrelerde başlar. Yeni hücreler yukarı doğru hareket ettikçe, yassı hücreli karsinom adı verilen bir cilt kanserinin oluşabileceği yassı hücreler haline gelirler. Bir başka cilt kanseri türü olan melanom ise, pigment hücrelerinde (melanositler) ortaya çıkar. Başlangıçta değişen tek bir hücre, önce artan büyüklükteki iyi huylu adenomlara ve ardından kötü huylu karsinomlara ilerleyen proliferatif bir hücre popülasyonuna yol açar. Kanser hücreleri alttaki bağ dokusunu istila eder ve kan ve lenf damarlarına nüfuz ederek tüm vücuda yayılır. (Anonim 2022)

2.2.1 Melanom epidemiyolojisi ve patogenezi

Cilt kanseri cildi etkileyen bir kanser türüdür. ABD'de 5 milyondan fazla cilt kanseri vakası rapor edilmiştir (Ward vd. 2017). En ölümcül cilt kanseri türlerinden biri ise melanomdur. Dünyadaki ölümlerin % 4' üne sebep olmaktadır. Melanom, yalnızca ABD'de yılda yaklaşık 10.000 ölümden sorumludur (Chang 2017). Melanom erken teşhis edilirse tedavi edilebilir. İnsan vücudunun diğer bölgelerine sıçrama özelliğine sahiptir

ve bu ölümcül hastalığı teşhis etmek için uzman bir dermatoloğa ihtiyaç vardır. Ancak enfekte olan kısımlar ile normal benler arasındaki görsel benzerlik nedeniyle en deneyimli doktorlar bile doğru teşhis koymakta zorluk yaşamaktadır (Sherif vd. 2019). Melanom tedavisi, önce enfekte cilt bölgelerinin dermoskopik görüntülerinin izlenmesi ve ardından uzman bir doktor tarafından doğrulanması ile yapılır (Esteva vd. 2017). Bununla birlikte, bir dermatoloğun melanomu erken evrelerde tespit etmesi hala zordur. Dermatologlar dermoskopik görüntülerde melanomu teşhis etmek için ABCDE ve yedi noktalı kontrol listesini kullanmaktadırlar (Ward vd. 2017, Alzahrani vd. 2019). ABCDE kuralı; melanomun erken saptanması için yaygın olarak kullanılan bir araç olup, hastaları ve sağlık uzmanlarını melanom tanısı konusunda uyarmak için tanımlanan ABCDE kısaltmasıdır (Çizelge 2.1) (Abbasi vd. 2004).

Çizelge 2.1 Melanom teşhisinde kullanılan ABCDE kuralı

İşaret	Açıklaması
A	Asimetri
B	Kenar düzensizliği
C	Renk değişimi
D	Çap > 6 mm
E	Gelişen (değişen)

Melanom öncü melanositik nevüslerde (iyi huylu deri lezyonu) (örn. konjenital nevüsler) gelişebilse de, vakaların %70'e kadarının de novo (yani, önceden var olan bir pigmentli lezyondan değil) ortaya çıktığına inanıldığına bilinmesi önemlidir. Melanomlar farklı klinik görünümlere sahiptirler ve doğru teşhisi zor ve zaman alıcı olabilir (Grob ve Bonerandi 1998). Bu süreci otomatikleştirmek ve bu ölümcül hastalığın tanımlanmasını hızlandırmak için, araştırmacılar kanseri erken evrelerinde tespit etmek üzere bilgisayar destekli teşhis araçları ve teknikleri kullanmaya başlamışlardır (Abbes vd. 2021). Normal melanositlerin melanom hücrelerine dönüştüğü (melanogenez) olayların sırası tam olarak anlaşılamamıştır. Büyük olasılıkla, hücre döngüsünü değiştiren ve melanositleri UVR'nin kanserojen etkilerine karşı daha duyarlı hale getiren çok aşamalı bir genetik mutasyon sürecinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Demierre ve Nathanson 2003). MM'nin

farklı alt tiplerinde, farklı oluşum yollarının yer alması muhtemeldir, örneğin yüzeysel yayılan MM'nin (SSMM), akut aralıklı güneşe maruz kalma ile ilişkili olduğu bilinmektedir (dos Santos Silva vd. 2009). Buna karşın lentigo maligna melanom (LMM) daha çok kronik olarak güneşe maruz kalan ciltte görülür (Kvaskoff vd. 2013). Melanom 4 farklı klinik alt tipte sınıflandırılabilir: yüzeysel yayılan melanom (SSMM), lentigo maligna melanom, nodüler melanom ve akral lentijinöz melanom (oluşum yeri ile karakterize edilir; avuç içi, ayak tabanı veya subungal). Malign melanom in-situ ve lentigo maligna premalign lezyonlar olarak kabul edilir.

Yüzeysel yayılan melanom (SSMM); genellikle 6 mm'den büyük düzensiz bir şekle sahip alacalı pigmentasyon (yani siyah, mavi, pembe veya beyaz renk değişikliği) ile düz veya hafifçe kabarık kahverengi lezyon olarak ortaya çıkma eğilimindedir (Şekil 2.9-2.10) (Abbasi vd. 2004).



Şekil 2.9 Malign melanom; düzensiz kenarlı ve alacalı pigmentli asimetric lezyona sahiptir (McCourt vd. 2014)



Şekil 2.10 Dermoskopi görüntüsü; lezyonun çevresinde yayılan çizgilerle düzensiz geniş pigment ağı

Lentigo maligna melanomu (LMM), alacalı şekil ve renge sahip, yavaş büyüyen veya değişen renksiz bir cilt yaması olarak kendini gösterir. Genellikle in situ lentigo malignadan (LM) invaziv LMM'ye doğru yavaş ilerleyici değişiklikler gösterirler ve ABCDE kuralı kullanılarak tespit edilebilir (Şekil 2.11) (Cohen 1995, McKenna vd. 2006).



Şekil 2.11 Lentigo maligna; düzensiz kenarlı - düzensiz pigmentli yama (McCourt vd. 2014)

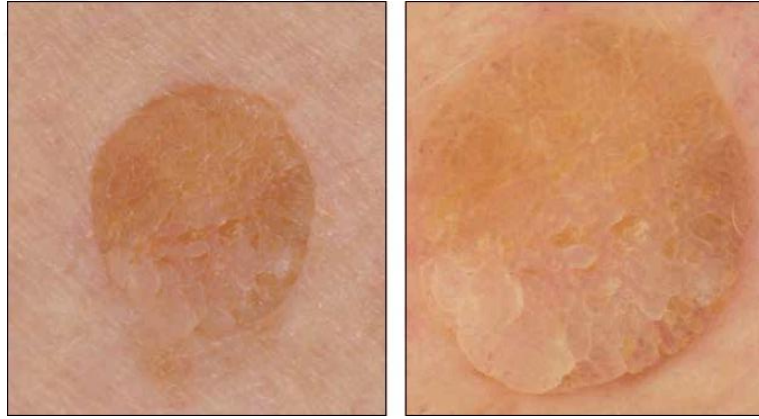
Nodüler melanom herhangi bir bölgede ortaya çıkabilir, ancak en yaygın olarak baş ve boynun açıkta kalan bölgelerinde görülür ve genellikle hızla büyüyen bir yumru (haftalar veya aylar) olarak ortaya çıkar. Nodüler melanomların üçte biri amelanotiktir, yani pigmentsizdir ve ülsera sebep olabilir. Bu genellikle teşhis güçlüğüne yol açabilir (Şekil 2.12) (McGovern 1975, Rao vd. 2010).



Şekil 2.12 Lentigo maligna melanom bölgesinde pigmentsiz eritematöz telenjektatik nodül (McCourt vd. 2014)

Akral lentiginöz melanom, rengi solmuş derinin yavaş yavaş genişleyen düz bir yaması olarak başlar ve ABCDE kuralını takip etme eğilimindedir. Başlangıçta pürüzsüz olmasına rağmen, daha sonra düzensiz bir yüzeyle daha kalın hale gelir. SSMM, beyaz deride açık ara en yaygın klinik melanom alt tipidir ve teşhis edilen vakaların yaklaşık %70' ini oluşturur. Buna karşılık, akral lentiginöz melanom beyaz hastalarda en az görülen alt tiptir ve daha çok Afro-Amerikan cilt tiplerine sahip hastalarda görülür (Tsao vd. 2012). Metastatik MM için yeni tedavilerden bazıları bu mutasyonları hedefler. Oluşum yeri ile ilgili olarak da belirgin cinsiyet farklılıkları vardır. Melanom en yaygın olarak beyaz erkeklerde gövdede (vakaların yaklaşık %40' ı) ve beyaz kadınlarda bacaklarda (yaklaşık %43) görülür (Gavin ve Evans, 1988).

Seborreik keratoz lezyonlar genellikle hafifçe kabarık, ten renginde veya kahverengi lekeler olarak görünür ve bunlar yavaş yavaş kalınlaşarak pürüzlü bir siğil yüzeyi geliştirir. Zamanla koyulaşarak koyu kahverengiden siyaha dönüşebilirler. Teşhislerine dair bir ipucu, 'yapışmış' görünümüdür (Şekil 2.13) (Hafner ve Vogt 2008).



Şekil 2.13 (a) Seboreik keratozun klinik görünümü (b) Dermoskopi görüntüsü — serebriform görünüm ve pigment ağı eksikliği (McCourt vd. 2014).

Pyojenik granülom lezyonları, hızla büyüyen (haftalar), genellikle kolayca kanayan ve ülserle sebep olan küçük kırmızı papüller olarak görünür. Çocuklarda ve genç erişkinlerde sık görülürler, travmayı takip edebilirler ve en sık baş, boyun, üst gövde ve eller (parmaklar) ve ayaklarda görülürler (Şekil 2.14) (Jafarzadeh vd. 2006, Amirchaghmaghi vd. 2008).



Şekil 2.14 (a) Başparmağın tabanında gevrek vasküler nodül b) yakından görüntü
(McCourt vd. 2014)

Benign melanositik nevusler konjenital veya edinsel (kavşak, dermal, bileşik tipler) nevüslere ayrılabilir. Düzgün pigmentli düzenli ve simetrikler (Şekil 2.15) (Tannous vd. 2005).



Şekil 2.15 İyi huylu melanositik nevus. Düzenli, simetrik ve düzgün pigmentli lezyon
(McCourt vd. 2014).

Displastik/atipik nevüsler aşağıdaki özelliklerden en az 3 tanesiyle olağandışı görünümüne: bulanık veya kötü tanımlanmış kenarlar, düzensiz şekil, alacalı renk, düz ve kabarık bileşenler, 6 mm veya daha büyük boyutlara sahiptir (Lober 1992, Kim vd. 2018).



Şekil 2.16 Displastik nevus; düzensiz şekilli koyu pigmentli nevus. 'Çirkin ördek yavrusu.'(McCourt vd. 2014)

Kiraz anjiom lezyonlar genellikle gövdede gelişir, kırmızı veya mavi/siyah renkte görünebilir. Kiraz anjiyomlarının sayısı genellikle orta yaşlı bireylerde artar ve Campbell de Morgan lekeleri olarak bilinir (Şekil 2.17) (Kim vd. 2009, Fernandez-Flores ve Colmenero 2018).



Şekil 2.17 (a)-vasküler görünüme sahip kiraz anjiyomunun klinik görüntüsü (b) Dermoskopik görüntü — vasküler lagünler (McCourt vd. 2014)

Pigmentli bazal hücreli karsinomu tipik olarak aylar ve yıllar içinde yavaş büyür. Pigmentli tip melanomayı taklit edebilir (Maloney vd. 1992).



Şekil 2.18 (a) + (b) — Pigmentli bazal hücreli karsinom. İnci telanjijiyetik nodüller

(a)'da sol altta ve (b)'de sağ yan kenar boyunca periferik pigmentasyon dikkat çekmektedir (McCourt vd. 2014)

2.2.1.1 Cilt tipi ve nevüs sayısı

Melanom için en önemli fenotipik belirteçler, açık ten ve ortalamanın üzerinde ben sayısıdır. Risk altındaki kişilerin belirlenmesi açısından >100 normal beni, atipik beni, birinci derece akrabalarında iki veya daha fazla melanom vakası varsa, kişilerin daha yüksek riske (yaklaşık 10 kat) sahip olduğu düşünülmelidir. Düşük (yaklaşık 2 ila 3 kat) risk seviyeleri ise çil, kızıl saç veya güneşte yanan cilt ve ailede herhangi bir melanom öyküsü ile ilişkilidir. Birincil korunmada cilt kanseri riski taşıyan kişiler öncelikle güneşten kaçınarak ve giyinerek cildini korumalıdır. Ayrıca 20 ila 30 güneş koruma faktörü (SPF) güneş kremi kullanmalıdırlar. İkincil koruma için yüksek risk kategorilerinden herhangi birinde yer alan kişiler, risk tahmini, benler ve pigmentli lezyonlar konusunda uzmanlaşmış bir dermatolog tarafından muayeneye yönlendirilmelidir (rutin randevu). 2 hafta içinde bir dermatoloğa acil sevk gerektiren vakalar şüpheli lezyonlar olarak kabul edilmelidir. Ergenlik çağının haricinde hızla büyüyen yeni bir ben, şekli veya rengi giderek değişen uzun süredir devam eden bir ben ve yaşı ne olursa olsun 3 rengi daha olan veya simetrisini kaybetmiş herhangi bir ben risk faktörüdür (Goldsmith vd. 1992). Aşağıda verilen çizelgede cilt tiplerine göre tipik özellikler ve bronzlaşma yetenekleri gösterilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Cilt tiplerine ait özellikler ve UVR altında ortaya çıkan eğilimleri

Cilt tipi	Tipik özellikler	Bronzlaşma yeteneği
Tip I	Çilleri, kızıl veya sarı saçları ve mavi veya yeşil gözleri olma eğilimindedir.	Genellikle yanar, nadiren bronzlaşır.
Tip II	Açık saçlara ve mavi veya kahverengi gözlere sahip olma eğilimindedir.	Genellikle yanar, bazen bronzlaşır.
Tip III		Bazen yanar, genellikle bronzlaşır.
Tip IV	Kahverengi saçlara ve gözlere sahip olma eğilimindedir.	Bazen yanar, çoğu zaman bronzlaşır.
Tip V	Doğal olarak siyah-kahverengi cilt. Genellikle koyu kahverengi gözleri ve saçları vardır.	-
Tip VI	Doğal olarak siyah-kahverengi cilt. Genellikle koyu kahverengi gözleri ve saçları vardır.	-

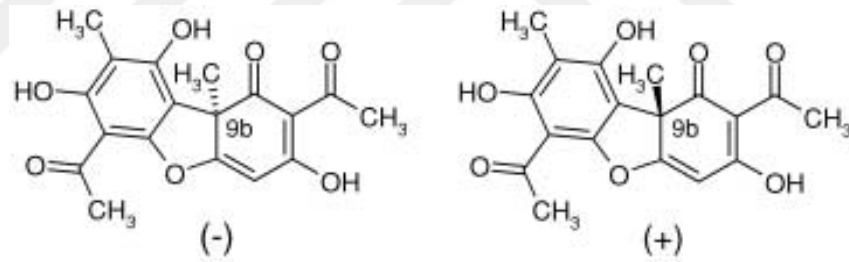
Cilt kanserinin en önemli çevresel nedeni güneşe maruz kalmaktır. Hastalara şezlong kullanımı, yaz tatili ve çocukluk çağındaki kabarcıklı güneş yanıkları dahil olmak üzere güneşe maruz kalma, güneşten korunma, güneş kremi kullanımı ve güneşten korunma önlemleri sorulmalıdır. Ultraviyole radyasyon (UVR), melanom gelişimi ile ilişkilidir ve UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) ve UVC (100-280 nm) olarak kategorize edilebilir (Cancer 1992). UVC'nin tamamı ve UVB'nin çoğu ozon tabakası tarafından bloke edilir ve dünyaya ulaşmazken, UVA'nın %19-50'si ve UVB'nin %9-14 ü yeryüzüne ulaşır. Kapalı alanda bronzlaşma, açık tenli bireylerde UV ışığına güneş dışı maruz kalmanın ana kaynağı haline gelmiştir. Kapalı bronzlaşma ekipmanı, UVB aralığında küçük bir fraksiyonla (<%5) esas olarak UVA ışığı yayar. Ev içi bronzlaşma cihazları ve UV ışık spektrumu, 2009 yılında insanlar için 1. grup kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (El Ghissassi vd. 2009).

2011'de yayınlanan bir araştırma 2010'da Birleşik Krallık'taki malign melanomların yaklaşık %86'sının güneş ve şezlonglardan kaynaklanan UVR'ye maruz kalmayla bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur (Parkin vd. 2011). Benzer şekilde, 2012'de yayınlanan ve 27 çalışmaya dayanan geniş bir meta-analiz, şezlong kullanımının göreceli risk teşkil ettiğini ortaya çıkarmıştır (Boniol vd. 2012). Şezlong Yasası (NI) 2011'in

gelecek yıllarda melanom insidansında bir azalmaya yol açacağı ümit edilmektedir (McCourt vd. 2014).

2.3 İlaç Aday Molekülü: Usnik asit

Usnik asit (UA) likenlerde bulunan sekonder bir metabolittir ve özellikle *Alectoria*, *Cladonia*, *Evernia*, *Lecanora*, *Ramalina* ve *Usnea* cinslerinde bol miktarda bulunur. Çevresel koşullara bağlı olarak değişmekle birlikte usnik asit, tallus kuru ağırlığının yaklaşık %4-8'ini oluşturur (Bjerke vd. 2005). Likenin yapısında bulunan mantar partnerinin sekonder metabolizmasının bir ürünüdür ve 9b konumunda bulunan metil grubunun oryantasyonunda farklılık gösteren iki adet enantiyomeri bulunmaktadır. Okuyama vd. (1995) tarafından HPLC tekniği ile usnik ve izo-usnik asidin optik izomerleri üzerine ilk kez kapsamlı bir çalışma gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.19) (Okuyama vd. 1995).



Şekil 2.19 (–) usnik asit ve (+) usnik asit enantiyomerlerinin yapısı. Stereojenik merkez 9b gösterilmektedir

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren bu bileşik hakkında taksonomik, fizyolojik, ekolojik, kozmetik, tıbbi-ilaç ve hatta tarım- ağaç yetiştirme alanlarını kapsayan yüzlerce makale yayınlanmıştır. Antibiyotiklerin keşfini ve insan sağlığına temel katkılarını yakından takip eden bilim dünyası, patojenik mikroplara karşı aktivitesi olan yeni aktif maddelerin arayışındadır. Likenlerde bu öncü çalışmalara konu olmuştur. Liken aktif maddeleri arasında usnik asit birçok bilim insanının ilgisini çekmiştir ve özel bir liken sekonder metaboliti olarak görülmektedir (Bjerke vd. 2005).

UA'nın antimikrobiyal, antiviral, antiprotozoal, antiproliferatif, anti-inflamatuar, anti-metastatik, anti-anjiyojenik, yara iyileştirici veya analjezik aktiviteleri vardır, bu da bu bileşiği farmasötik endüstrisinin önemli bir hedefi haline getirmektedir (Takai vd. 1979, Galanty vd. 2019). Saf bir madde olarak UA, kremler, diş macunları, gargaralar, deodorantlar ve güneşten koruyucu ürünler gibi çeşitli ticari ürünlerde kullanılmaktadır (Ingolfstodt 2002). UA'nın kemirgen hücrelerinde yağ metabolizmasını ve bazal metabolizma hızını arttırdığı da bildirilmiştir ve böylece kilo kaybı için kullanılan takviyelerin bir bileşeni haline gelmiştir (Guzow-Krzemińska vd. 2019).

UA yüksek oranda lipofiliktir ve biyolojik zarlardan kolayca difüze olur, bu da proton gradyanlarının bozulmasına neden olur. Proton gradyanının iç mitokondriyal membran boyunca dağılması, elektron taşınması ve ATP sentezi arasındaki eşleşmeyi bozar ve UA sitotoksitesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Abo-Khatwa vd. 1996). UA sitotoksitesinin mitokondriyal membran potansiyelinde düşüş, oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu, ROS üretimi, ATP seviyesinde düşüş ve elektron taşıma zinciri, krebs döngüsü ve lipid metabolizması ile ilişkili genlerin aşırı ekspresyonu gibi durumlar ile kanser hücrelerinde mitokondriyal bozulmalara neden olduğu gösterilmiştir. Bu tür olayların ise apoptoz, nekroz ve otofajiyi başlattığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Bessadottir vd. 2012, Sahu vd. 2012, Antonenko vd. 2019).

UA ve türevlerinin antikanser aktivitesi ilk olarak 1970'lerde Lewis akciğer karsinomu ve/veya lösemi hücreleri için rapor edilmiştir. Takai vd. (1979), artan lipofilikliğe sahip UA türevlerinin kanser hücrelerine karşı daha sitotoksik olduğunu ve maksimum sitotoksite için β -triketon fonksiyonunun gerekli olduğunu göstermiştir. In-vitro' da sentetik türevlerin hiçbirinin UA'nın kendisinden daha güçlü olmadığı belirlenmiştir (Takai vd. 1979). In-vivo olarak, UA asetatları ve bunların β -triketon kısmı ve sağlam intramoleküler hidrojen bağları ile çok yakın analogları, 100-200 mg/kg'lık yüksek dozlarda orta düzeyde antitümör aktivitesi göstermiştir (Takai vd. 1979, Guzow-Krzemińska vd. 2019). Daha sonra, UA'nın hem (-) hem de (+) izomerlerinin, fare ve insan kanser hücrelerine karşı in-vitro olarak orta ila yüksek seviyede sitotoksite sergilediği gösterilmiştir (Luzina ve Salakhutdinov 2016). Örneğin, yumurtalıktaki (A2780), memedeki (MCF-7 ve SKBR-3), kolondaki (HT-29 ve HCT116), lösemideki

(HL-60 ve Jurkat) ve serviksteki (HeLa) hücrelerde (+) UA'nın IC₅₀'sinin 48.5-199.2 µM (MTT, 72 saat) aralığında olduğu bulunmuştur (Bačkorová vd. 2011).

2.3.1 Usnik asitin anti-tümör etkilerine genel bir bakış

Usnik asidin antitümör mekanizmaları, tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu, apoptozun indüklenmesi ve tümör anjiyogenezinin inhibisyonu olarak özetlenebilir (Çizelge 2.3). In-vitro çalışmalarda, altı adet liken ekstraktının kanser ve inflamasyondaki farmakolojik aktiviteleri araştırılmıştır (Ingelfinger vd. 2020).

Usnik asitin, tümör hücrelerinin canlılığının azalması, apoptoz ve hücre döngüsünün inhibisyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. İlgili olarak, usnik asitin BGC823 insan mide karsinomu hücre hattında, A549 insan akciğer karsinomu hücresinde, MCF7 insan meme kanseri hücre hattında ve LNCaP insan prostat kanseri hücre hattında hücre bölünmesinin G1 fazında tutulumu (durma) tetiklediği gösterilmiştir (Eryilmaz vd. 2018, Geng vd. 2018). Ayrıca usnik asitin 100 µM konsantrasyonunun HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında hücre döngüsünün S fazında tutulumu indükleyebildiği de ortaya konulmuştur (Bačkorová vd. 2011). Tüm bu veriler, usnik asitin bütün hücre tiplerinde hücre döngüsünün durmasını tetiklemediği ve farklı hücre tiplerinde farklı sinyal yollarında yer aldığını göstermektedir.

Ayrıca usnik asitin U937 insan lösemi hücresi, MG-63 insan osteosarkom hücresi ve A375 insan melanom hücresinin proliferasyonunu zamana ve doza bağlı bir şekilde (Chen vd. 2020) ve insan prostat kanseri PC-3M hücrelerini in-vitro olarak konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe edebildiği tespit edilmiştir (Sun vd. 2021a). Usnik asidin etki mekanizmasının, tümör hücrelerinde DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunun inhibisyonu ile ilişkili olabileceği ve böylece prostat kanseri hücrelerinin proliferasyon hızını azalttığı veya tümör hücrelerinin apoptozunu hızlandırdığı düşünülmektedir (Wang vd. 2019).

Yakın tarihli bir araştırma, usnik asidin STAT3 ve RAS yollarını sinerjik olarak azaltarak PD-L1 proteininin sentezini engelleyebileceğini, HeLa hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu azaltabileceğini, birlikte kültürlenmiş T hücrelerinin tümör hücrelerine sitotoksitesini artırabileceğini ve rahim ağzı kanserinin çoğalmasını engelleyebileceğini göstermiştir (Sun vd. 2021). Bununla birlikte, usnik asitin, hücre proliferasyonu, anjiyogenezi, hücre göçü ve istilasını inhibe ederek, sonuçta tümör büyümesini inhibe ederek PD-L1 ekspresyonunu aşağı regüle edebileceği düşünülmektedir (Wang vd. 2019).

Usnik asit, mide tümör hücrelerinde apoptoz ile ilgili proteinlerin ifadesini düzenleyerek kanser hücrelerinin antiproliferasyon ve apoptozunda rol oynar ve ayrıca hücre döngüsünün durmasını ve otofajiyi tetikler. Usnik asidin hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını inhibe edebilen, apoptozu ve otofajiyi indükleyen önemli etkilere sahip olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca usnik asitin ksenograft modellerinde 5-FU'dan (Fluorourasil, kanseri tedavi etmek için kullanılan sitotoksik bir kemoterapi ilacıdır) daha iyi bir antitümör etkiye sahip olduğu değerlendirilmektedir (Geng vd. 2018).

In-vitro deneyler, usnik asidin morfolojik değişiklikleri indükleyen, hücre proliferasyonunu zamana ve doza bağlı bir şekilde inhibe eden, hücre döngüsünü bloke eden, apoptozu teşvik eden ve otofajiyi indükleyen önemli etkilere sahip olduğunu doğrulamıştır. Bu arada, in-vivo deneyler, usnik asidin vücut ağırlığını etkilemeden tümör büyümesini inhibe etmede ve tümör dokularındaki Bax ve Bcl2 miktarını düzenlemede tek başına 5-FU'ya kıyasla önemli ölçüde daha etkili olduğunu da göstermiştir (Wang vd. 2022).

İnsanların yaşam ortamlarındaki değişiklikler, yaşam baskısındaki artışlar, ekonomik ve çevresel faktörlerin etkisi kanser insidansındaki artışa katkıda bulunmaktadır. Kanser tedavisinde farmakolojik yaklaşım ve etkili anti kanser ilaçlarının kullanımı, hastaların uzun sağ kalım süreleri elde etmesine yardımcı olabilmektedir. Usnik asidin de kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını engellediği ve kanser tedavisi açısından umut vadettiği düşünülmektedir.

Çizelge 2.3 Usnik asitin anti-tümör aktivitesi ve ilgili mekanizmaları

Hücre Hatları	Mekanizma	IC ₅₀	Yıl	Referans
İnsan mide kanseri hücre hattı - BGC82	Hücre döngününün durmasını, apoptoz ve otofajiyi tetikleyerek insan mide karsinomu hücrelerinin çoğalmasını baskılar.	236.55 µM	2018	(Geng vd. 2018)
İnsan mide kanseri hücre hattı - SGC7901		618.82 µM	2018	(Geng vd. 2018)
İnsan akciğer kanseri hücre hattı - A549	G0/G1 fazı hücre döngüsü durmasını içeren hücre büyümesini inhibe eder ve insan akciğer karsinomu hücrelerinde mitokondriyal membran depolarizasyonu ve apoptoz indüksiyonu yoluyla hücre ölümünü indükler.	Bilinmiyor	2013	(Singh vd. 2013)
İnsan meme kanseri hücre hattı MCF7	Normal hücrelere zarar vermeden ve apoptotik hücre ölümünü ve G0/G1 hücre döngüsü durmasını indüklemeyen HDPC ve HDPC hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etkiler.	71.4 µM	2018	(Eryilmaz vd. 2018)
İnsan prostat kanseri hücre hattı LNCaP		77.5 µM	2018	(Eryilmaz vd. 2018)
İnsan kolon karsinomu yabancıl tip p53 HCT-116 p53+/+ hücreleri	Hücre döngüsünü etkiler ve apoptozu teşvik eder.	157.2 µM	2011	(Bačková vd. 2011)
İnsan kolon karsinomu yabancıl tip p53 HCT-116 p53-/- hücreleri		143.1 µM	2011	(Bačková vd. 2011)
İnsan lösemi hücre hattı U937	Proliferasyon, doza bağlı ve zamana bağlı bir şekilde inhibe edilebilir. Usnik asit tarafından indüklenen U937 hücrelerinin apoptozu, kaspaz bağımlı mitokondriyal yolakla ilgilidir.	90.90 µmol/L (24 h) 54.08 µmol/L (48 h)	2020	(Yu vd. 2020)

Çizelge 2.3 Usnik asitin anti-tümör aktivitesi ve ilgili mekanizmaları (devam)

İnsan osteosarkom hücre hattı MG-63		103.00 $\mu\text{mol/L}$ (24 h) 90.48 $\mu\text{mol/L}$ (48 h)	2020	(Yu vd. 2020)
İnsan prostat kanseri hücre hattı PC-3M	DNA replikasyonunun ve tümör hücrelerinin RNA transkripsiyonunun inhibisyonu, sonuçta prostat kanseri hücrelerinin proliferasyon hızının yavaşlamasına veya tümör hücrelerinin apoptozunun hızlanmasına yol açan DNA sentezine müdahale eder.	Bilinmiyor	2005	(Sun vd. 2005)
İnsan akciğer kanseri hücre hattı A549	STAT3 ve RAS yollarını birlikte azaltarak PD-L1 protein sentezini inhibe eder, mTOR sinyal yollarının baskılanması yoluyla MiT/TFE nükleer translokasyonunu indükler ve lizozomların biyogenezini ve proteoliz için PD-L1'in lizozomlara translokasyonunu teşvik eder; PD-L1'i aşağı regüle ederek sırasıyla hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi, göçü ve istilayı inhibe eder, böylece tümör büyümesini inhibe eder.	Bilinmiyor	2021	(Sun vd. 2021b)
İnsan rahim ağzı kanseri hücre hattı HeLa		Bilinmiyor	2021	(Sun vd. 2021b)
İnsan rahim ağzı kanseri hücre hattı SiHa		Bilinmiyor	2021	(Sun vd. 2021b)
İnsan rahim ağzı kanseri hücre hattı CaSKi		Bilinmiyor	2021	(Sun vd. 2021b)
Fare hepatoselüler karsinom hücre hattı H22	VEGF ve bFGF üzerindeki usnik asit üzerindeki inhibitör etki	Bilinmiyor	2016	(Hao vd. 2020)

Çizelge 2.3 Usnik asitin anti-tümör aktivitesi ve ilgili mekanizmaları (devam)

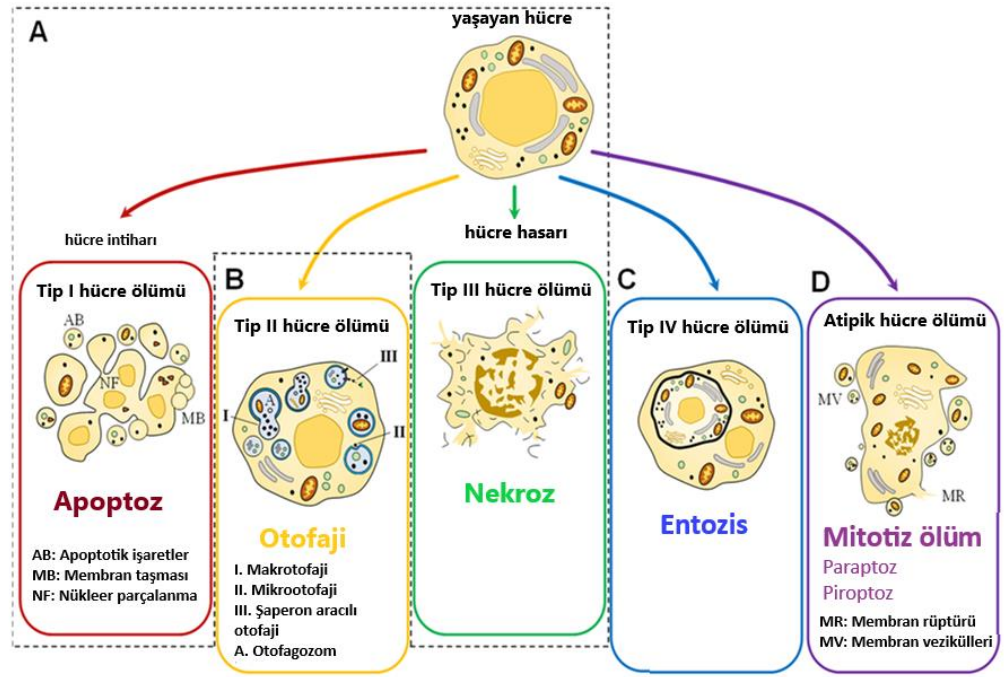
İnsan meme tümörü hücre hattı Bcap-37	Fare ksenograft tümör modelinde farelerin vücut ağırlığını etkilemeden Bcap-37 meme tümörü büyümesini ve anjiyogenezi baskılar; Endotel hücre çoğalmasını, göçünü ve tüp oluşumunu inhibe eder. In vitro endotelyal hücrelerde morfolojik değişiklikleri ve apoptozu indükler; Endotel hücrelerinde vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) 2 aracılı hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinazlar 1 ve 2 (ERK1/2) ve AKT/P70S6K sinyal yollarını bloke eder.	Bilinmiyor	2012	(Song vd. 2012)
Lewis akciğer kanseri hücreleri	/	Bilinmiyor	1975	(Morris Kupchan ve Kopperman, 1975)
S180 Rulman Fareler	/	İnhibisyon oranı; 75.1% (50 mg/kg) 66.6% (80 mg/kg) 69.1% (120 mg/kg)	1996	(Wang vd. 2022)
İnsan kolorektal kanser HT-29 hücreleri	/	55 µM	2013	(Milot vd. 2013)

2.4 Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölümü yaşamın sonu olduğu düşünülen temel ve oldukça organize bir biyolojik fenomendir. Bilim dünyasının, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin çok hücreli organizmaların gelişimi ve devamlılığı için bir gereklilik olduğunu anlaması uzun sürmüştür. 1842 yılında Carl Vogt, ebe kurbağasının notokordunun, omurların oluşumuna izin vermek üzere, metamorfoz sırasında hücre ölümüyle kaldırıldığını tanımlayan ilk kişi olmuştur (Vogt ve Vogt 1842, Krüger ve Richter 2022). Ardından 1960'lı yıllarda gerçekleştirilen genetik çalışmalar, organizmaların gelişimi sırasında hücre ölümünün endojen genlerin ekspresyonuna bağlı olduğunu göstermiş ve programlanmış hücre ölümü kavramının ortaya çıkmasına yol açmıştır (Lockshin ve Williams 1964, Tata 1966, Lockshin ve Zakeri 2001). Son olarak, elektron mikroskopu aracılığıyla 1970'li yıllarda farklı hücre ölüm tiplerinin ultrayapısal özellikleri tanımlanmıştır (Kerr 1972).

Son dönemlerde hücre ölümü mekanizmaları hakkında sahip olunan bilgi oldukça artmış ve çeşitli mekanizmalar tanımlanmış olmasına rağmen, aralarındaki karmaşık etkileşimler ve benzerlikler nedeniyle farklı hücre ölümü tiplerini doğru şekilde sınıflandırmak halen zordur (Krüger ve Richter 2022). Basit bir ifadeyle, hücre ölümü iki şekilde gerçekleşebilir (Şekil 2.20A). Birinci yol, genlerin kontrolü altında aktif hücre ölümü sürecini tanımlayan fizyolojik bir hücre ölüm şekli olan apoptoz (programlanmış hücre ölümü veya "hücre intiharı"; bugün tip 1 hücre ölümü olarak sınıflandırılmaktadır) yoludur. Bu şekilde ölen hücreler, örneğin gelişim veya doku homeostazı sırasında sitoplazmik büzülme, nükleer yoğunlaşma, zar ve organel bütünlüğünün korunmasını içeren morfolojik özellikler sergilemektedirler (Kerr 1972, Krüger ve Richter 2022). Apoptoza yol açan apoptozun içsel ve dışsal yolları olarak bilinen iki temel sinyal yolağı vardır. Apoptozun dışsal yolağı, hücre dışı ortamdaki koşullar bir hücrenin ölmesine neden olduğunda, bir hücrenin dışında başlar. Apoptozun içsel yolağı, hücre içinde yaralanma meydana geldiğinde başlar ve ortaya çıkan stres apoptotik yolu aktive eder (Peter 2011).

Diğer ana hücre ölümü türü, stres olaylarına yanıt olarak meydana gelen kontrolsüz bir hücre ölümü şekli olan nekrozdur (Tip III hücre ölümü). Bu hücreler, hücre hasarı, metabolik bozukluklar, patojenik istila veya fizyolojik doku hasarı gibi stresörlerin bir sonucu olarak şişer ve patlar (Kerr 1972). Ek olarak otofaji (Tip II hücre ölümü, Şekil 2.20B) ve entozis (Tip IV hücre ölümü, Şekil 2.20C) olmak üzere iki diğer hücre ölümü tipi de ayırt edilebilmektedir (Krüger ve Richter 2022).



Şekil 2.20 Morfolojik olarak ayırt edilebilen hücre ölümü türlerinin basitleştirilmiş gösterimi

(A) İki temel hücre ölüm tipi, apoptozis (Tip I) ve nekrozis (Tip III). Son araştırmalar ayrıca diğer iki hücre ölüm tipi arasında ayırım yapmaktadır: (B) Otofajik hücre ölümü (Tip II) ve (C) entozis (Tip IV). (D) Diğer moleküler tipler ise 'atipik hücre ölümü' kategorisinde gruplandırılır

2.4.1 Tip I hücre ölümü – Apoptozis

Apoptoz, hücre ölümünün en önemli biçimi olarak kabul edilmektedir ve moleküler sinyal işleme mekanizması oldukça iyi araştırılmıştır. Apoptotik yolların belirlenmesi kritik bir öneme sahiptir ve apoptoz ile ilişkili hastalıkların patojenezinin anlaşılmasını da kolaylaştırır. Bu durum belirli apoptotik yolları yahut belirli genleri hedefleyen yeni

ilaçların keşfine de olanak sağlayabilmektedir. Memelilerde dışsal (ölüm reseptörü tarafından gerçekleştirilen yol) ve içsel (mitokondri aracılığıyla gerçekleşen yol) olmak iki temel apoptotik yol vardır. Bu iki yol haricinde daha az bilinen kaspaz aktivasyon yolları da mevcuttur. Bunlar endoplazmik retikulum stresi (ER) aracılığıyla aktifleştirilen ve apoptozda kaspaz-12 ya da kaspaz-2'nin başlattığı yol ve T hücresi aracılı sitotoksisteyi içeren perforin/granzim yoludur (Szegezdi vd. 2003).

Kaspazlar içsel ve dışsal apoptoz yollarındaki anahtar düzenleyici proteinlerdir (Yuan ve Akey 2013). Gelişimsel, apoptotik ve inflamatuvar yollar ve ilaveten farklı yollardaki spesifik fonksiyonlar temelinde üç grup memeli kaspazı bulunur (Weyhenmeyer vd. 2012). Kaspaz-1 gibi bazı kaspazların apoptozun yürütülmesinde rolü yoktur. Bazı kaspazların ise hem apoptotik hem de apoptotik olmayan sinyalleşmede ikili rolü vardır. Ayrıca kaspazlar, apoptotik sinyal kaskadlarındaki lokasyonlarına nazaran başlatıcı (kaspaz-8 ve -9), efektör ya da uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak sınıflandırılırlar (Hu vd. 2013). Otokatalitik olarak aktive edilen başlatıcı kaspazlar (pro-kaspazlar), sıralı olarak parçalanır ve akış aşağı "efektör" kaspazlarını (infazcı kaspazlar olarakta bilinir) aktive ederler. Daha sonra, efektör kaspazlar, esas hücresel bileşenleri ayırmak üzere hücrenin proteolitik parçalanmasını düzenler (Green ve Evan 2002).

2.4.1.1 Apoptozdaki morfolojik değişiklikler

Apoptotik hücre ölümünün hem çekirdeği hem de sitoplazmayı ilgilendiren morfolojik değişiklikleri, hem hücre tipleri hem de hücre türleri arasında önemli ölçüde benzerdir (Saraste ve Pulkki 2000, Bakke 2001). Çoğunlukla hücre ölümünün başından son hücresel parçalanmaya dek birkaç saat gerekmektedir. Süresi hücrenin tipine, uyarıya ve apoptotik yoluna bağlıdır (Ziegler ve Groscurth 2004). Çekirdekte meydana gelen apoptozun sahip olduğu morfolojik özellikler, hücrenin yuvarlanması, hücre hacminin azalması (piknoz) ve psödopodların geri çekilmesi ile birlikte süregelen kromatinlerin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma olarak bilinmektedir (Kroemer vd. 2005). Kromatin yoğunlaşması ise, nükleer zar civarında başlayarak ve hilal ya da halka benzeri bir biçim oluşturur. Kromatin, karyoreksis özelliği taşıdığı için sağlam bir zara sahiptir ve bir hücre

içinde parçalanana kadar daha fazla yoğunlaşır (Majno ve Joris 1995). Plazma zarı, süreç boyunca bozulmadan kalır. Apoptozun bir sonraki aşamasında gözlenen morfolojik özellikler, zar taşması, sitoplazmik organellerin ultrastrüktürel modifikasyonu ve zar yapısının kaybını içerir (Kroemer vd. 2005). Fagositik hücreler ise çoğunlukla, apoptotik cisimlerin oluşmasından önce apoptotik hücreleri yutar. Apoptotik hücre kalıntıları, hücre kültürü koşullarında fagosit edilmediği takdirde, nekroz benzeri bir bozunmaya uğrar ve bu durum ikincil nekroz olarak adlandırılır (Ziegler ve Groscurth, 2004).

2.4.1.2 Apoptozdaki biyokimyasal modifikasyonlar

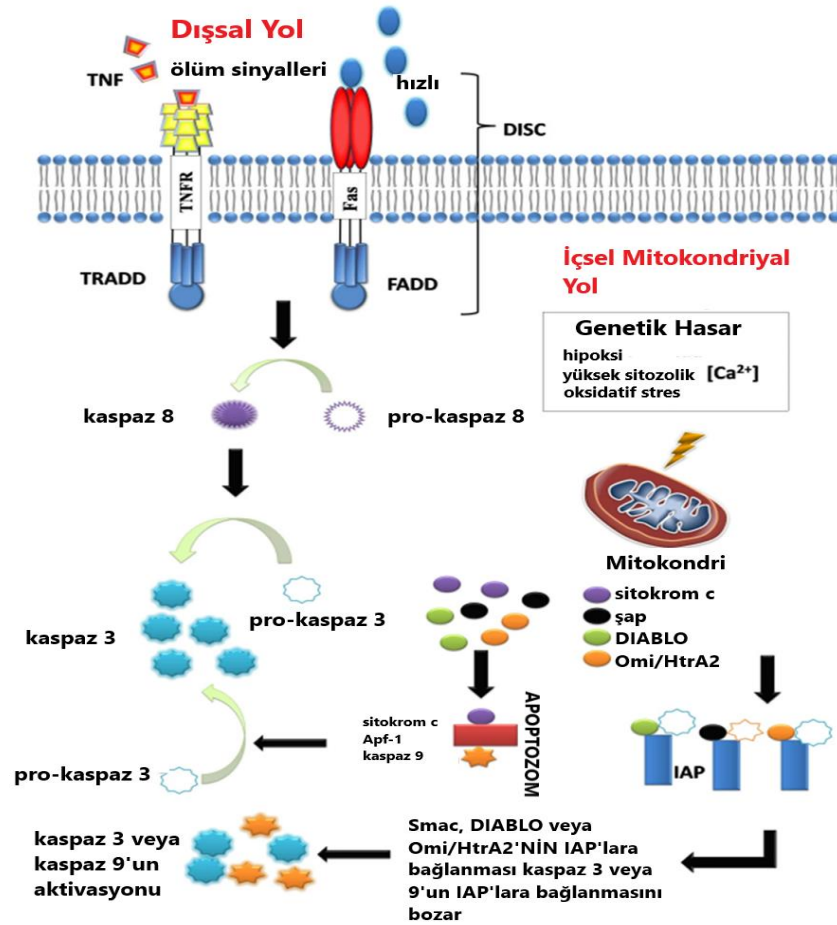
Biyokimyasal açıdan apoptozda 1) kaspaz aktivasyonu, 2) DNA'nın ve proteinin yıkımı ve 3) fagositik hücreler tarafından membran değişikliği ve tanınması olmak üzere üç temel biyokimyasal değişiklik olduğu bilinmektedir (Robbins ve Kumar 2010). Erken apoptozda, hücre zarının dış katmanında iç katmanlardan "fırlatılmış" fosfatidilserin (PS) ifadesi meydana gelmektedir. Bu durum, ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasını ve proinflatuar hücresel bileşenler salınmadan fagositozla sindirilmesini sağlar (Hengartner 2001). Takiben, DNA 50 - 300 kilobaz arasında değişen büyük parçalara karakteristik bir şekilde ayrılır (Vaux ve Silke 2003). Ardından, DNA'nın endonükleazlar aracılığıyla internükleozomal bölünmesi, 180-200 baz çiftinin katları şeklinde oligonükleozomlara bölünmesi, gelmektedir (McCarthy ve Evan 1997).

Apoptozda ait bir başka özellik ise, kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteaz ailesinde mevcut belli bir grup enzimin aktive olmasıdır. "Kaspaz"ın "c"si bir sistein proteaza atıfta bulunurken, "aspaz" enzimin hedef proteinlerinin aspartik asit kalıntılarından parçalama niteliğini ifade eder (Yakkanti vd. 2018). Aktif kaspazlar oldukça önem arz eden birçok hücresel proteini, nükleer iskeleyi ve hücre iskeletini parçalar. İlaveten nükleer DNA'nın fragmentasyonunu gerçekleştirecek olan DNAazı aktive ederler (Lavrik 2005). Biyokimyasal değişiklikler apoptozda görülen bir takım morfolojik değişiklikleri kısmi olarak açıklamaktadır (Lavrik 2005). Apoptozun belirlenmesinde birçok biyokimyasal analiz kullanılsa da, Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (NCCD), ultrastrüktürel değişiklikler arasında net bir eşdeğerlik olmadığı için hücre ölümü modalitelerinin

sınıflandırılmasının tamamen morfolojik kriterlere dayanması gerektiğini önermektedir (Maiuri 2007).

2.4.1.3 Apoptoz mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Bu da mevcut genleri ya da yolları hedef alan yeni ilaçların geliştirilmesini sağlayabilir. Kaspazlar, başlatıcı ve de uygulayıcı olmaları açısından apoptozun merkezinde yer almaktadır. Kaspazların aktivasyon sağladığı üç yol bulunmaktadır. Üzerinde en fazla çalışma yapılan iki başlatma yolu apoptozun içsel (mitokondriyal) ve dışsal (ölüm reseptörü) yollarıdır (Şekil 2.21). Üçüncü yol ise az bilinen ve içsel endoplazmik retikulum yolu olarak adlandırılan bir diğer bir başlatma yoludur (O'Brien vd. 2008).



Şekil 2.21 Apoptozun içsel ve dışsal yolları (Wong 2011)

2.4.1.4 Ekstrinsik (dışsal) ölüm reseptörü yolu

Ekstrinsik ölüm reseptörü yolu ölüm ligandı ile ölüm reseptörü bağlandığı takdirde başlatılmaktadır. Üzerinde en fazla durulan ölüm reseptörü; tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) şeklinde isimlendirilen proteinlerdir. Bu proteinlerin ligandları ise TNF ve Fas ligandı (FasL) olarak isimlendirilmektedir (Hengartner 2001). Ölüm reseptörleri, TNF reseptör ailesine aittir. TRADD, FADD gibi adaptör proteinleri ve Kaspaz-8 gibi sistein proteazları toplamaya hizmet eden bir hücre içi ölüm alanı ile karakterize edilir. Kaspaz-8'in kümelenmiş reseptör üzerinde aktivasyonu, apoptoza yol açar. Ölüm reseptörlerinin tetiklenmesi, üç reseptör bağlama yeri sergileyen homotrimerik tip-2 membran proteinleri olan TNF ailesinin spesifik ligandlarının bağlanması yoluyla gerçekleşir. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu modüle etmenin çeşitli yolları vardır. Ölüm reseptörleri, tuzak reseptörleri tarafından da düzenlenebilir. Sitotoksik TRAIL ligandı beş reseptörle etkileşime girer, bunlardan sadece ikisi (TRAIL-R1 ve -R2) bir ölüm alanına sahiptir. TRAIL-R3, bir glikolipid tarafından zara bağlanır ve TRAIL'e duyarlı hücrelerde aşırı eksprese edildiğinde, TRAIL aracılı apoptozun baskın bir negatif inhibitörü olarak hareket eder. Apoptotik yolla etkileşime giren hücre içi proteinler, ölüm reseptörlerinin potansiyel modülatörleridir. FLIP, yapı olarak Kaspaz-8'e benzer, ancak proteaz aktivitesinden yoksundur. Ölüm reseptörlerinin apoptotik sinyalini inhibe etmek için hem FADD hem de Kaspaz-8 ile etkileşime girer ve aynı zamanda NF- κ B aktivasyonuna yol açanlar gibi diğer sinyal yollarını aktive edebilir (Schneider ve Tschopp 2000).

Ölüm ligandları ölüm reseptörlerine bağlanarak, adaptör protein için bağlanma alanı oluşturur. Oluşan ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi ise, ölüme sebep olan sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinmektedir (O'Brien vd. 2008). DISC ise sonrasında pro-kaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar. Kaspaz 8 ise enzimin aktif formu olarak, akış aşağı ya da uygulayıcı kaspazları parçalar ve bu sayede apoptozu başlatır (Wong 2011).

2.4.1.5 İntersik mitokondriyal yol

İntersik yol hücrenin içinde başlamaktadır. Hipoksi yani onarılamayan genetik zarar, sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunun yüksek olması ve oksidatif stres içsel mitokondriyal yolun başlamasına neden olan bazı uyarılardır (Wong 2011). İçsel yol, sitokrom-c proapoptotik moleküllerin mitokondriyal geçirgenlik aracılığıyla sitoplazmaya aktarılmasıyla başlatılır (Cell 2004).

Bcl-2 proteinlerine ait, proapoptotik proteinler (örn. Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) ve antiapoptotik proteinler (örn. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) olmak üzere iki ana grup bulunmaktadır (Tsujimoto vd. 1984). Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriden salınımını engellemekte ve apoptozu bu şekilde düzenlemektedirler (Kroemer 2007). Sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı ise şu şekilde gerçekleşmektedir; apoptozom (Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşur) kompleksi oluşumu yoluyla kaspaz 3 aktive edilir (Kroemer 2007). Smac/DIABLO ya da Omi/HtrA2 ise, IAP'lerin inhibitörüne bağlanır ve kaspaz aktifleşmesini teşvik eder (Kroemer 2007, LaCasse vd. 2008).

2.4.1.6 Ortak yol

Apoptozun meydana gelme aşamalarında, bir dizi kaspazın aktive edilmesi gerekir. İntersik yolda kaspaz 9, ekstrinsik yol için ise kaspaz 8 bu aktivasyonu sağlar (Ghobrial vd. 2005). Ardından akış aşağı kaspazlar, protein kinazları, hücre iskeleti proteinlerini, DNA onarım proteinlerini ve endonükleaz ailesinin inhibitör alt birimlerinin bölünmesini indükler. İlavenen apoptozda ortaya çıkan yapısal farklılıklarla hücre iskeleti, hücre döngüsü ve sinyal yollarında etkileri mevcuttur (Ghobrial vd. 2005).

2.4.1.7 İnterinsik endoplazmik retikulum yolu

İnterinsik endoplazmik retikulum (ER) yolu ise üçüncü bir yol olarak kabul edilmektedir. Kaspaz 12'ye bağımlı ancak mitokondriden bağımsız hareket etmektedir (Szegezdi 2003). Dış veya iç hücresel stresin genel stres sinyalleşmesine koordinasyonu, organizma gelişimi sırasında hücre büyümesi ve hayatta kalması için hayati önem taşıyan önemli bir hücresel süreçtir. Endoplazmik retikulum (ER), önemli biyosentetik, stres algılama ve sinyal verme işlevleri sağlayan merkezi bir ökaryotik hücresel organeldir (Wang ve Kaufman 2012, Sasaki ve Yoshida 2015). ER, salgı yolu için hedeflenen proteinlerin katlanması ve post-translasyonel modifikasyonlarındaki rolüne ek olarak, hücreler içinde verimli bir oksitleyici ve Ca^{2+} açısından zengin katlanma ortamını da korur (Travers vd. 2000, Bánhegyi vd. 2012). Calnexin, calreticulin, glikozla düzenlenen protein GRP78 (HSPA5, BiP olarak da adlandırılır) ve protein disülfid izomerazlar gibi ER'de yerleşik şaperonlar, protein katlanması, sinyal iletimi ve Ca^{2+} tamponlamanın sürdürülmesinde rol oynar (Yu vd. 1999, Luo vd. 2013). Hipoksi, ER Ca^{2+} tükenmesi, oksidatif hasar, hipoglisemi ve viral enfeksiyonlar gibi patofizyolojik durumlar ER homeostazını etkiler ve protein katlanma süreçlerini engeller (Wang ve Kaufman 2014, Zhang vd. 2017). Bu aktiviteler nihayetinde protein katlama yükü/kapasitesiyle fizyolojik durum arasında “ER stresi” olarak bilinen bir dengesizliğe neden olur. ER stresi, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan ve ER-UPR'nin çeşitli süreçlerini uyumlu hale getirerek ER homeostazını yeniden kuran iyi koordine edilmiş ve entegre bir sinyal iletim yolu aracılığıyla (UPRER) hücre sağkalımını desteklemek için bir stres yanıtı başlatır (Schröder ve Kaufman 2005, Luo vd. 2013). Şiddetli ve onarılamaz ER stresinin varlığı, içsel apoptoz yolunun aktivasyonuna yol açar (Schröder ve Kaufman 2005, Schröder 2008). Hücre ölümünü indüklemenin başka bir yolu olan otofaji de, ER stresi altında hücresel bütünlüğü koruyarak bu tür çözülmemiş strese yanıt olarak etkinleştirilebilir (Yorimitsu vd. 2006, Høyer-Hansen ve Jäättelä, 2007).

2.4.1.8 Pro-apoptotik / anti-apoptotik proteinlerin bozulması

Proteinlerin hücre içerisinde pro- veya anti-apoptotik aktivite gösterdiği bilinmektedir. Hücre ölümü düzenlenirken bu proteinlerin (pro- ve anti-apoptotik) miktardan ziyade birbirlerine oranı önemlidir. Ek olarak, belirli genlerin aşırı veya yetersiz ifadesinin, kanser hücrelerinde apoptozu azalttığı ve karsinogeneze katkıda sağladığı bilinmektedir (O'Brien vd. 2008).

2.4.1.9 Bcl-2 protein ailesi

Bcl-2 ailesi, apoptozda çok önemli bir rol üstlenen proapoptotik ve anti-apoptotik protein grubundan oluşmaktadır (Gross 1999). Bcl-2, bu ailenin ilk tanımlanan proteini olma özelliği taşımaktadır ve adını insanda bulunan B-hücreli lenfoma 2'den almaktadır (Tsujimoto vd. 1984). Bcl-2 üyeleri genel olarak mitokondriyal dış zarı üzerinde lokalize olmaktadır. Bcl-2, iyon kanalı şeklinde ya da gözeneklerin oluşturulması yoluyla zar geçirgenliğinden sorumlu olan dimerlerdir (Minn vd. 1997). Bcl-2 ailesi üyeleri işlevleri ve homoloji domainlerinin çeşidine göre üç gruba ayrılmaktadır (Dewson ve Kluck 2010). Bcl-2 ailesine ait anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeler arasında bir dengesizlik olduğunda ise düzensiz apoptoz oluşmaktadır.

2.4.1.10 p53 tümör proteini

p53 proteini, 17. kromozomda en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerden birisi olarak bilinmektedir ve ismini moleküler ağırlığından almaktadır (53 kDa) (Levine 1991). Yalnızca apoptozun indüksiyonunda yer almaz, bununla birlikte hücre döngüsünün düzenlenmesi, gelişim, farklılaşma, gen amplifikasyonu, kromozomal ayrışma ve hücre yaşlanmada da etkili olan bir proteindir. Aynı zamanda "genomun koruyucusu" olarak da isimlendirilir (Lane 1992, Oren ve Rotter 1999). İnsan kanserlerinin %50'sinden fazlası p53 geninde meydana gelen kusurlar ile ilişkilendirilmiştir (Bai ve Zhu 2006). Avery-Kieida vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, apoptoz ile hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan birtakım p53 genlerinin, melanom hücrelerinde normal olmayan

bir biçimde ifade edildiği gösterilmiştir ve bu durumun hücrelerin proliferasyonuna etki ettiği bildirilmiştir (Avery-Kiejda vd. 2011). Ek olarak, p53 ekspresyonu ve insan kanser hücrelerinin büyümesi arasında bir ilişki olduğu da tespit edilmiştir (Vikhanskaya vd. 2007).

2.4.1.11 Apoptoz proteinlerin inhibitörleri (IAP'ler)

IAP'ler, apoptozu, sitokinezi ve sinyal iletimini düzenleyen bir protein grubudur (LaCasse vd. 2008). Bugüne kadar sekiz adet IAP tanımlanmıştır: NAIP, c-IAP1, c-IAP2, X-linked IAP, Survivin, Apollon, Livin/ML-IAP ve IAP benzeri protein 2 (Vucic ve Fairbrother 2007). IAP'ler kaspazların endojen inhibitörleri olarak işlev görürler. BİR alanlarını kaspazların aktif bölgelerine bağlarlar ve aktif olan kaspazların bozulmasını teşvik ederler ya da kaspazları substratlarından uzak tutup kaspaz aktivitesini inhibe edebilirler (Wei vd. 2008). Birçok kanserde düzensiz IAP ekspresyonu rapor edilmiştir. Örneğin, Lopes vd (2007), pankreas kanseri hücrelerinde IAP ailesinin anormal ekspresyonunu ve bu anormal ekspresyonun kemoterapiye dirençten sorumlu olduğunu göstermiştir. Pankreas hücrelerinde cIAP-2'nin ekspresyonu ile ilaç direnci arasında anlamlı şekilde ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Lopes vd. 2007). Ayrıca, Livin proteinin melanom ve lenfomada ciddi miktarlarda ifade edildiği gösterilmiştir (Srinivasula vd Ashwell 2008). Apollon proteinin ise gliomalarda yüksek ifade olduğu ve sisplatin ve kamptotesin direncinden sorumlu olduğu bulunmuştur (Ashhab vd. 2001). Başka bir IAP olan Survivin proteininde çeşitli kanserlerde aşırı ifade edildiği bildirilmiştir (Small vd. 2010). IAP'lerin de-regulasyonu, nörodejeneratif bozukluklara ve kansere yol açabilmektedir. Yapılan çalışmalar, cIAP'lerin proto onkogenler olduğunu doğrulamıştır ve birçok malignitede IAP ailesinin çeşitli üyelerinin artan seviyeleri gözlenmiştir (Yang vd. 2003, Wright vd. Duckett 2005).

2.4.1.12 Azaltılmış kaspaz aktivitesi

Kaspaz ailesi genel itibariyle iki gruba ayrılmaktadır: (1) kaspaz 1 ile ilgili olanlar (örn. kaspaz-1, -4, -5, -13 ve -14) ve (2) apoptozda merkezi görev üstlenenler (örn. kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10). İkinci grup ayrıca (1) apoptotik yolun başlatılmasından birincil olarak sorumlu olan başlatıcı kaspazlar (örneğin kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve (2) efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6) olarak sınıflandırılabilir. Kaspaz -7 ise apoptoz sırasında hücrel bileşenlerin gerçek bölünmesinden sorumlu olanlardır (Fink ve Cookson 2005). Kaspazlar, apoptozun başlatılması ve yürütülmesinde önemli oyuncularından biri olmaya devam etmektedir (Shen vd. 2010). Bazı durumlarda, birden fazla kaspaz aşağı regüle edilerek tümör hücresinin büyümesine ve gelişmesine katkıda bulunabilir. Bir cDNA dizisi diferansiyel ekspresyon çalışmasında, hem kaspaz-8 hem de -10'un birlikte aşağı regülasyonunu gözlemlenerek bunun koriokarsinom patogeneziye katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Fong vd. 2006).

2.4.1.13 Bozulmuş ölüm reseptörü sinyali

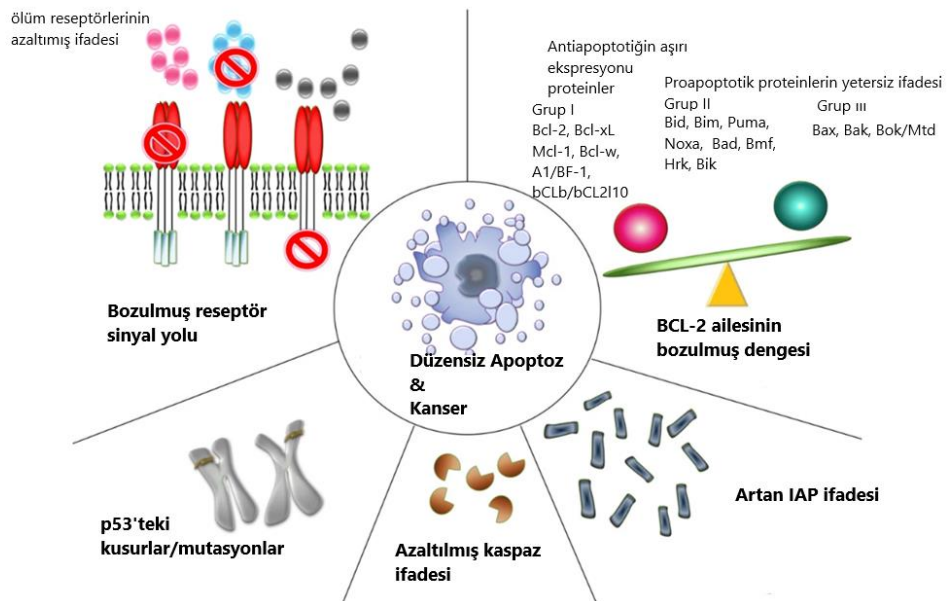
Ölüm reseptörlerine ait ligandlar, apoptozun dışsal yolağının kilit oyuncularıdır. TNFR1 ve Fas dışında, DR3, DR4, DR5, DR 6, EDAR ve NGFR yer almaktadır (Jänicke 2009). Bu reseptörler ölüm domainine sahip olup, ölüm sinyali tarafından harekete geçirildiğinde, moleküller ölüm domainine çekilerek sinyal kaskadını aktive ederler. Bununla birlikte, ölüm ligandları, bir ölüm domainine sahip olmayan ölüm reseptörlerini tuzağa düşürmek için de bağlanabilir, sinyal kompleksleri oluşturamaz ve sinyal kaskadını başlatamazlar (Jänicke 2009).

Bu tür anormallikler, reseptörün aşağı regülasyonunu, reseptör fonksiyonunun bozulmasını ve ölüm sinyallerinin azalışını tetikler. Bunların tümü, bozulmuş sinyalleme ve sonuç olarak apoptozun azalmasına katkıda bulunur. Örneğin, tedaviye dirençli lösemi veya nöroblastoma hücrelerinde CD95 ekspresyonunun azalışının rol oynadığı bilinmektedir (Fulda vd. 1998, Fulda 2010). Ölüm reseptörlerinin azalan

ekspresyonu ve tuzak reseptörlerin anormal ekspresyonun çeşitli kanserlerde ölüm sinyal yollarından kaçınmada rol oynadığı bildirilmiştir (Fulda 2010).

2.4.1.14 Apoptozun kanserdeki rolü

Bir dizi genetik değişikliğin neticesinde hücre ölümünden kaçınan normal bir hücrenin kötü huylu bir hücreye dönüşebildiği bilinmektedir (Weinberg ve Hanahan 2000). 1970'li yıllarda, Kerr vd. (1972) tarafından ortaya konan çalışmalarda apoptoz potansiyel olarak kötü huylu hücrelerin eliminasyonu, hiperplazi ve aynı zamanda tümör ilerlemesinin engellenmesiyle ilişkilendirilmiştir (Kerr vd. 1972). Bu sebeplerden dolayı, hücrede apoptoz direncinin azalması karsinogenezde elzem bir rol üstlenir. Kanserli hücrelerin apoptoz direncinin azalmasında olası birçok yol bulunmaktadır. Genel manada, apoptozdan kaçınmaya yol açan olaylar serisi 1) pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin bozulması, 2) kaspaz fonksiyonunun azalması ve 3) ölüm reseptörü sinyalinin bozulması olarak ifade edilmektedir. Apoptoz ve karsinogenezden kaçınmaya katkıda bulunan hücresel mekanizmalar şekil 2.22'de özetlenmektedir (Lowe ve Lin 2000).



Şekil 2.22 Apoptoz ve karsinogenezden kaçınmaya katkıda bulunan hücresel mekanizmalar (Wong 2011)

Uygun ve doğru apoptotik sinyallerin meydana gelişi, hücre ölümü ve hücre sağ kalımı arasındaki dengenin korunması ve genom bütünlüğünün sağlanması için çok önemlidir. Apoptozdan kaçınmanın kanser oluşumundaki rolü de bu bulguyu desteklemektedir (Plati vd. 2011). Kanserli hücreler, apoptotik yolları ve dolayısıyla mekanizmaları transkripsiyonel, translasyonel ve post translasyonel açıdan değiştirebilir. Belirgin bir şekilde, bu mekanizmalar özel değildir ve kanser hücreleri apoptozdan kaçınmak için bir dizi farklı strateji kullanabilir (Fulda 2009).

Hücrede pro- veya antiapoptotik aktivite gösteren birkaç protein tanımlanmıştır. Bu pro- ve anti-apoptotik proteinlerin oranı, hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Pro- ve anti-apoptotik proteinlerin dengesindeki bozulmanın, kötü huylu hücrelerin apoptozunu azaltarak karsinogeneze katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Örneğin, pro- ve anti-apoptotik BCL-2 protein oranlarındaki dengesizlik, kanser hücresinin apoptoza uğramak yerine hayatta kalmasına neden olabilmektedir (Kang ve Reynolds 2009). Bu durum sırasıyla pro-apoptotik proteinlerin yetersiz ve anti-apoptotik proteinlerin ise aşırı ifade olmasından veya her iki koşulun beraber ortaya çıkmasından kaynaklanabilir. Çok çeşitli insan kanserlerinde, Bcl-2 ailesinin birkaç pro-apoptotik üyesinin hem genetik hem de epigenetik değışiklikler gösterdiği bildirilmiştir (Galluzzi vd. 2010). Pro-apoptotik BCL-2 ailesi proteinlerinin etkisizleştirilmesine ek olarak, yüksek seviyelerde anti-apoptotik üyelerinin varlığı, kanserde apoptozun düzensizliğinin açık bir göstergesidir (Fulda 2009). Anti-apoptotik proteinler, stres sinyallerinin üstesinden gelmek için kanser hücrelerinde yaygın olarak aşırı ifade edilirler. Anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinlerinin aşırı ifadesi genellikle kanser terapötikleri başta olmak üzere nüks ve kötü prognoz direnç ile ilişkilidir (Wuilleme-Toumi vd. 2005).

Ayrıca mikroRNA'ların (miRNA'lar) düzensizliği de farklı insan kanserleri ile ilişkilidir. miRNA'ların onkogenler ve tümör baskılayıcılar olarak işlev görebileceğine dair bulgular söz konusudur (Croce 2009). MiRNA'lar, apoptotik yollarda yer alan farklı mRNA'ları, özellikle BCL-2 ailesi proteinlerini hedefleyerek, anti-apoptotik veya pro-apoptotik düzenleyiciler olarak görev yapmaktadırlar (Garofalo vd. 2010, Chen vd. 2015). Örneğin miR-15/16, antiapoptotik faktörü (Bcl-2) hedefler ve miR-15/16'nın kaybı veya ifadesinin

azalması, bazı tümörlerde Bcl-2 seviyesinin yükselişi ile ilişkili bulunmuştur (Cimmino vd. 2005, Allegra vd. 2014).

Son yıllarda IAP'lerin onkojenik rolünün yanı sıra, cIAP'lerin NF-KB aktivitesini kısıtlamada tümör baskılayıcı bir rolü olduğu da gösterilmiştir. Bir dizi çalışma, cIAP'lerin mutasyonlarının veya translokasyonlarının, çok sayıda kanserde NF-κB sinyalinin yapısal aktivasyonundan sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (Lau ve Pratt 2012). Bu çalışmalar, cIAP'lerin hem aşırı ekspresyonunun hem de kaybının metastazı ve tümör istilasını destekleyebileceğine işaret etmektedir (Lau ve Pratt 2012, Tchoghandjian vd. 2013).

2.4.2 Tip II hücre ölümü – Otofaji

Otofaji, hücrelerin parçalanma için otofagozomlar aracılığıyla bileşenlerini lizozoma yönlendirdiği fizyolojik süreç için kullanılan genel bir terimdir. 1950'lerde elektron mikroskopunun gelişmesiyle Christian de Duve, çeşitli hidrolazların varlığını tespit ederek hücre organellerinden lizozomların keşfine yol açmıştır (De Duve vd. 1955). 1963'te de Duve, otofajiyi, hücrelerde protein içeren veziküllerin lizozomlarla birleşmesiyle birlikte hücresel proteinin ayrıştığı/bozulduğu bir fenomen olarak adlandırmıştır. Bu veziküllere ise otofagozom adı verilmektedir. Otofaji genel olarak makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA) olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.23) (Ichimiya vd. 2020).

Otofaji terimi genellikle makrotofajiyi ifade eder. Makrotofaji, kargoyu parçalayarak ortaya çıkan makromoleküllerin geri dönüştürülmesine izin verir. Sitoplazmik makrotofaji substratları, otofagozom olarak bilinen ve daha sonra lizozomlar ve vakuollerle birleşen geçici bir çift membranlı organel içinde sınırlandırılır (Şekil 2.23). Substratların makrotofaji yoluyla geri dönüşümü, hücresel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar (Mizushima vd. 2002).

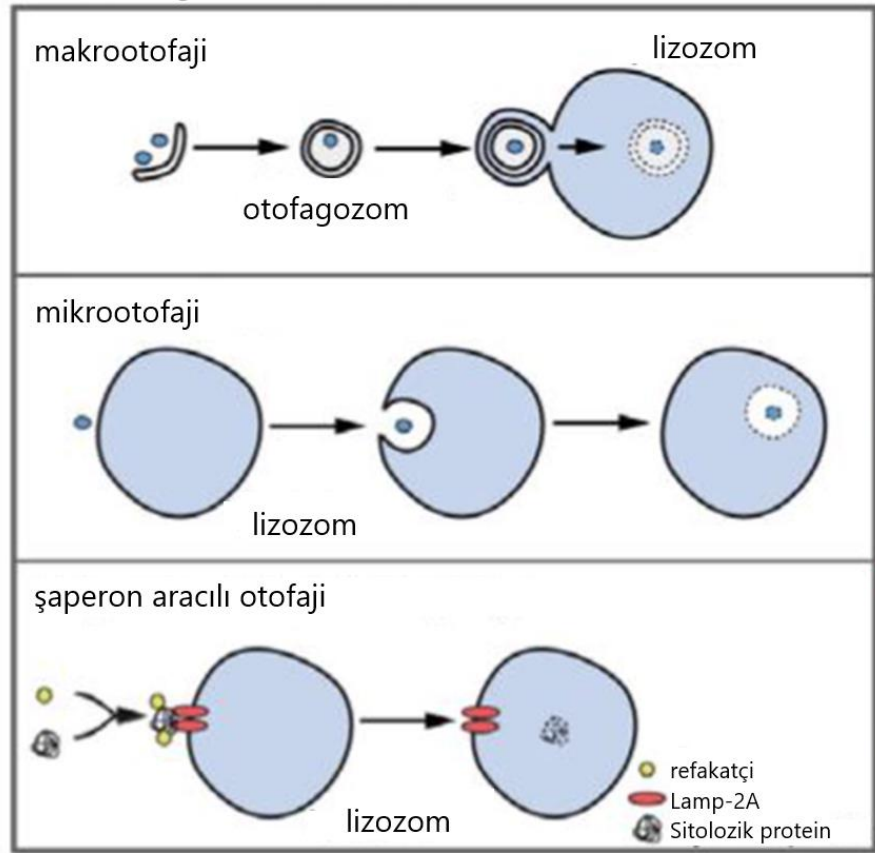
CMA, yalnızca lizozomal bozunma için proteinleri hedefleyen seçici bir otofaji şeklidir (Şekil 2.23). Bu yolun hücrel metabolizmadaki ana rolünün, protein yıkımını takiben üretilen serbest amino asitlerin sağlanması olduğu tahmin edilmiştir. Bununla birlikte, son çalışmalar, bozulmuş CMA'nın glikoz ve lipid metabolizmasını ve sonuç olarak tüm organizmanın enerji metabolizmasını önemli ölçüde değiştirdiğini ve aynı zamanda çeşitli besinlere yanıt olarak hücrel metabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Tasset ve Cuervo 2016).

Mikrootofaji, lizozom membranının içeriye doğru çöküşü ile birlikte lizozomun sitoplazmayı doğrudan sindirmesi ve içeriğinin lizozom içinde hazmedilmesi ile karakterize edilen seçici olmayan bir lizozomal bozunma işlemidir (Şekil 2.23). Homeostazi ve hücre sağkalımını sürdürmede rolü vardır (Mijaljica vd. 2011). Ayrıca, otofaji mekanizmaları, hücre içi maddeleri parçalamak ve bozulma ürünleri sağlamak için birbirini tamamlar ve in vivo homeostazın korunmasına izin verir.

Otofajinin bozulması, ubiquitinasyonun inhibisyonuna, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine, mitokondriyal fonksiyonun azalmasına ve artan genomik kararsızlığa neden olarak hücre içi bileşenlerin kalitesinde genel bir düşüşe sebep olur. Böylece otofajinin bozulması hücrel homeostazi bozar ve çeşitli hastalıkların gelişmesine katkıda bulunur (Bi ve Li 2013, Liu vd. 2015).

Son çalışmalar, otofajinin sadece hastalıkta değil, aynı zamanda yaşlanma ve yaşam süresinin uzamasında da rol oynadığını bildirmiştir (Meléndez vd. 2003). Otofajinin aktivasyonunun, birkaç model organizmada yaşam süresinin uzatılması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, otofaji fonksiyonunun yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir (Fernández vd. 2018).

Otofaji Tipleri



Şekil 2.23 Otofaji türleri ve kargo seçiciliği

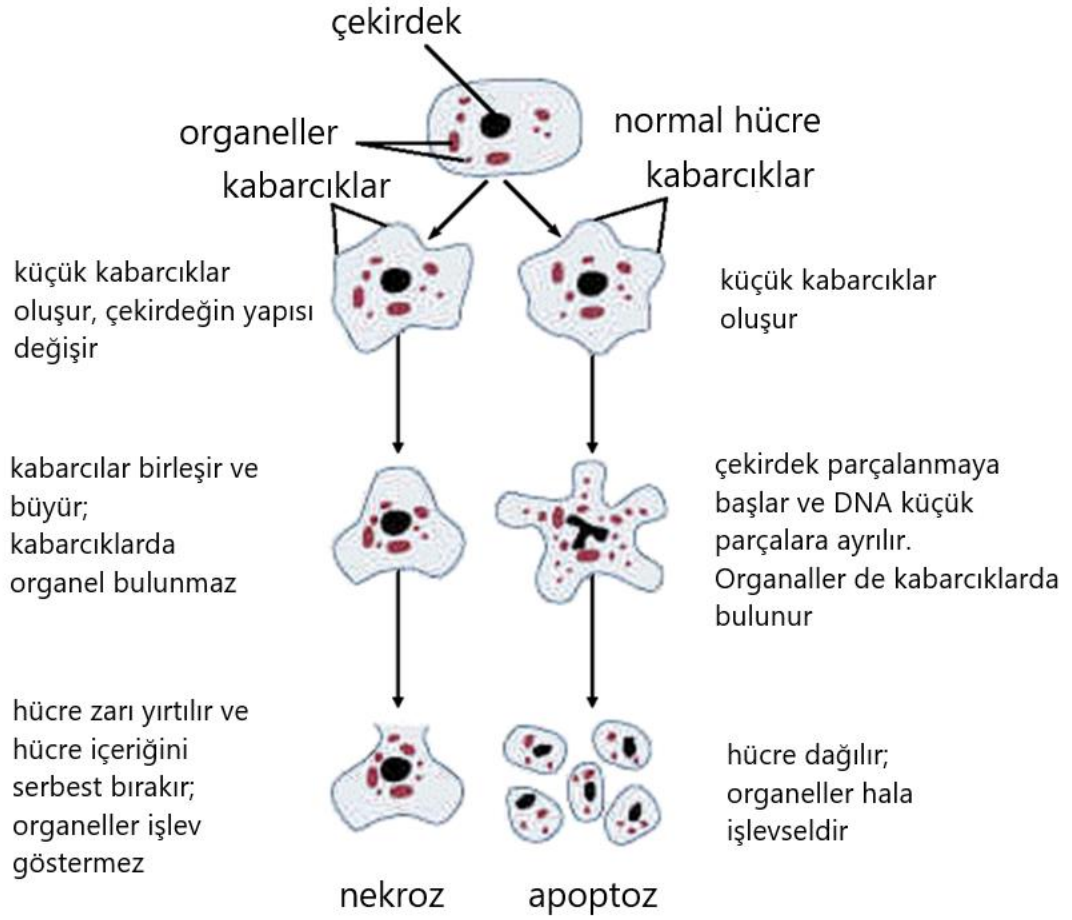
Çizim, ana otofaji türlerini göstermektedir. Makrootofaji, sitozol ve organellerin çift membranlı bir vakuol olan otofagozom tarafından sekestrasyonunu içerir; otofagozom daha sonra bir lizozomla kaynaşır ve asit hidrolazlar içeriğini bozar. Mikrootofaji süreci, lizozom tarafından doğrudan istila edilen sitoplazmik materyalin bozulmasını içerir. Şaperon aracılı otofaji, şaperonlara bağlanan spesifik sitozolik proteinlerin bozulmasını gerektirir ve kompleks, lizozomal reseptör Lamp-2A reseptörüne bağlanır ve lümene translokasyonu tetikler

2.4.3 Tip III hücre ölümü – Nekrosis

Patolojik süreçlerden dolayı geri dönüşü olmayan hücre hasarı ve nihai hücre ölümü nekroz olarak adlandırılır. Hücre organellerinin şişmesi, plazma zarının yırtılması ve nihayetinde hücrenin parçalanması ve hücre içi içeriğin çevre dokulara dökülmesiyle doku hasarına yol açan kontrolsüz bir hücre ölümüdür (Ruffolo 1964). İçsel sinyallerden oluşan apoptoz olarak bilinen programlanmış hücre ölümünün aksine nekroz, hücre

dışından gelen aşırı zararlı uyarıcılar nedeniyle oluşur. Nekroz çoğunlukla, proinflamatuvar sitokin interlökin-1 beta'nın (IL1) inflamatuvar aktivasyonuna ve salgılanmasına neden olan ısı şoku proteinleri, ürik asit, ATP, DNA ve nükleer proteinlerin salınmasına bağlı olarak inflamatuvar yanıtlarla ilişkilidir (Festjens vd. 2006). Tipik olarak nekroz, kaspaz aktivasyonu veya normal gelişim ile ilişkili değildir, ancak nekroptoz, piroptoz ve ferroptoz gibi farklı düzenlenmiş nekroz türleri tanımlanmıştır. Apoptoz gibi, kaspazlar, kinazlar ve poliubikuitin sistemi gibi enzimatik yollar nekroptoz ve piroptozda ana role sahiptir (Lockshin ve Zakeri 2001, Tonnus vd. 2019). Özellikle nekroptoz, hem apoptoz hem de otofaji ile birkaç önemli süreci paylaşır (D'Arcy 2019). Senkronize düzenlenmiş nekroz, ferroptozda spesifik lipid peroksidasyonunun sonucudur (Tonnus vd. 2019).

Nekroza yol açan hücresel mekanizma, zararlı bir uyarana maruz kalmanın bir sonucu olarak hücre zarı bütünlüğünün kaybıdır ve böylece hücre dışındaki iyonların hücre içine hareket etmesine izin verilir. Bu durumu ise hücrenin ve organellerin şişmesi takip eder (Şekil 2.24). Başka bir hücresel mekanizma, proteazlar, RNAazlar, DNAazlar ve fosfatazlar gibi proteolitik enzimlerin hücre içine salınmasına yol açan lizozomal zarın bozulmasıdır. Bunlar sitozolde aktive edildiğinde DNA, RNA ve proteinlere zarar verir. Bu enzimler, hücre yıkımına neden olan hücresel bileşenlerin sindirimine neden olur. Bu mekanizmaların her ikisi de hücre içi içeriğinin çevreleyen dokuya dökülmesine yol açan plazma zarının bozulmasına yol açar (Guicciardi ve Gores 2009).

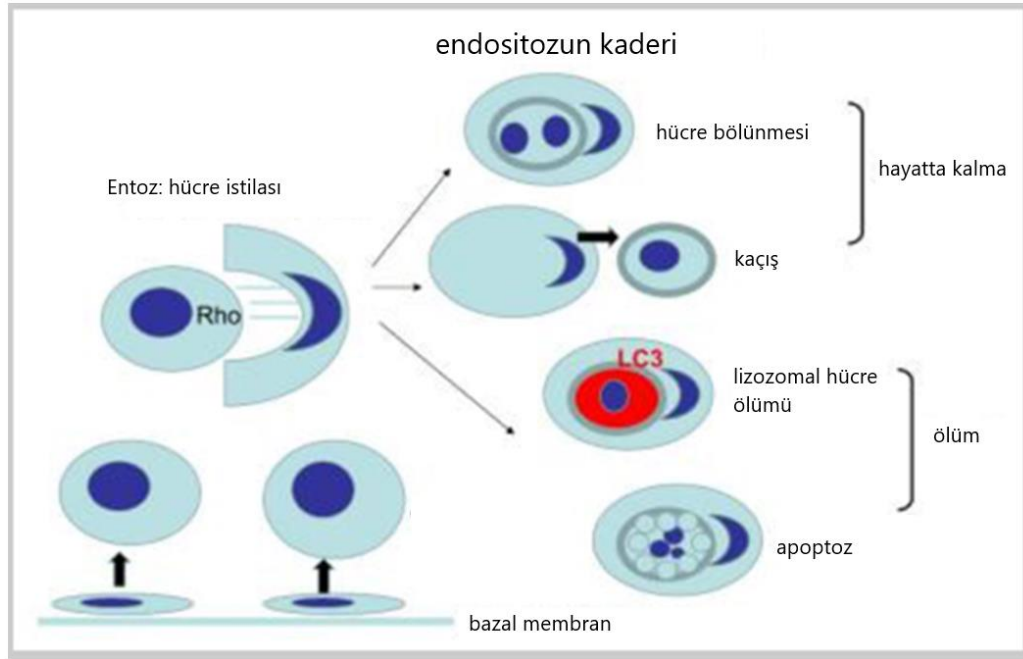


Şekil 2.24 Nekrozda gerçekleşen yapısal değişiklikler

2.4.4 Tıp IV hücre ölümü – Entozis

Entozis, adezyon moleküllerinin katılımı, aktin hücre iskeleti ve enerji harcanması ile bir canlı hücrenin aynı tipteki diğerine invazyonu anlamına gelir (Fais ve Overholtzer 2018, Mlynarczuk-Bialy vd. 2020). Entozis terimi ilk olarak 2007 Overholtzer tarafından yeni bir hücre ölümü tipi olarak tanımlanmıştır (Overholtzer vd. 2007). Entozis, epitel hücreleri ve epitel kanserleri için karakteristiktir ve hücrelerin bazal membrandan ayrılmasıyla tetiklenir. Entozis sonucunda karakteristik hücre içi hücre (CIC) yapıları oluşur (Mackay ve Muller 2019).

Bir kez yutulduktan sonra, entotik hücreler, yaygın olarak LC3 ile ilişkili fagositoz (LAP) olarak bilinen spesifik bir otofaji ile ilgili süreç yoluyla, entotik vakuol (entozom) içindeki düzenlenmiş hücre ölümü yoluyla elimine edilebilir (Florey vd. 2011). Bu süreç apoptotik yoldan bağımsızdır (Overholtzer vd. 2007, Mlynarczuk-Bialy vd. 2020). Bununla birlikte, entozisin farklı sonuçları olabilmektedir (Şekil 2.25).



Şekil 2.25 Hücrede entozis ile meydana gelebilen farklı sonuçlar

2.4.5 Atipik hücre ölümü - Mitotik ölüm, paraptosis, piroptosis

Mitotik Ölüm: Glücksmann ve Spear (1939) ilk olarak mitotik evrede radyasyona yanıt olarak anında azalan ve tedaviden birkaç saat sonra tekrar ortaya çıkmayan bir hücre fraksiyonu tanımladılar (Glücksmann ve Spear 1939). Detaylı mikroskopik inceleme, radyasyon sonrası ilk mitotik tepe noktasında (mitotik hücrelerin yeniden ortaya çıkması) veya sonrasında ölmeye başlayan anormal konfigürasyona sahip hücrelerin varlığını ortaya çıkardı (Gray 1952).

1986'da araştırmacılar, "mitotik ölümü/felaket", aktive edilmiş bir cdc2 aleli ile resesif sıcaklığa duyarlı bir weel mutasyonunun birleştirilmesiyle oluşturulan bir maya suşunun öldürücü fenotipi olarak tanımladılar. Bu fenomen, kromozomların ayrılması ve septum oluşumu ile ilgili olarak mitozu erken giriş değil, mitozun anormal yürütülmesinin sonucuydu (Russell ve Nurse 1986). Bununla birlikte, gecikmiş mitozla bağlantılı hücre ölüm mekanizmasını açıklamak için mitotik felaket terimi ilk kez 1995 yılında kullanılmıştır (Swanson vd. 1995). Günümüzde mitotik felaket, mitotik aparat kusurları, DNA hasarı ve mitotik kontrol noktası hataları nedeniyle mitozu tamamlayamayan hücrelerin hayatta kalmasını önleyen onkosupresif bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Vitale vd. 2011). Mitotik felaket, programlanmış hücre ölümünün (PCD) ayrı bir şekli değildir; daha ziyade, çeşitli hücre ölümlerinden önce gelen bir aşamadır. Mitotik defektler, ekzojen ve endojen kaynaklardan kaynaklanabilir. Endojen kaynaklar, anormal ploidi oluşumunun neden olduğu mitotik stresi ve yüksek düzeyde replikatif stresi içerir (Neelsen vd. 2013).

Moleküler bozulmalara bağlı olarak, mitotik felaket, apoptoz, nekroz veya otofaji olmak üzere üç tip hücre ölümüyle sonuçlanabilir. Ayrıca, mitotik felaket, gelişimi tümörün yok edilmesini olumsuz yönde etkileyen ve sonuç olarak terapötik etkiyi azaltan farklı hücre yaşlanması türleri ile ilişkilendirilebilir (Mlynarczuk-Bialy vd. 2020).

Paraptozis: Paraptozis (Yunanca παρά para, "ile ilgili" ve apoptozdan), apoptoz ve nekroz ile benzerlik gösteren, kaspazdan bağımsız programlanmış bir hücre ölümüdür. Endoplazmik retikulum ve mitokondrinin şişmesini içeren geniş sitoplazmik vakuolasyon ile karakterizedir (Sperandio vd. 2004). Paraptozik hücreler, nükleer parçalanma, apoptotik cisim oluşumu ve kromatin yoğunlaşması dahil olmak üzere apoptoz özelliklerinden yoksundur. Ayrıca, otofajik vakuoller mevcut değildir. Vakuolasyon mekanizmasında büyük potasyum kanallarının (BK kanalları) yer aldığı öne sürülmüştür (Kessel 2020).

Paraptozis, transkripsiyon ve translasyon gerektirir ve çeşitli hücre tiplerinde farklı yollardan indüklenebilir. Ayrıca, süreç spesifik inhibitörler tarafından durdurulabilir

(Kessel 2020). Paraptozis, özellikle apoptoza dirençli kanser hücrelerinde yeni tedavi edici ilaçlar geliştirmek için alternatif bir ölüm yolu olarak kullanılabilir. Ayrıca, paraptozun moleküler mekanizması, klinik immünoterapinin ve kansere karşı aşılamanın geliştirilmesinde rol oynayabilir (Khalili ve Radosevich 2018).

Piroptozis: Piroptozis, genellikle mikrobiyal enfeksiyonun neden olduğu, iltihaplanmaların aktivasyonu ve pro-inflamatuar sitokinler interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) olgunlaşmasının eşlik ettiği bir inflamatuvar hücre ölümüdür (Shi vd. 2015).

Gasdermin ailesi proteinleri, piroptozun yürütücüleridir. Kaspazlardan veya granzimlerden üretilen gasderminlerin sitotoksik N-terminali, gasdermin proteinlerinin proteaz aracılı bölünmesi, oligomerize olur ve hücre zarı boyunca gözenek oluşturarak IL-1 β , IL-18'in salınmasına yol açar (Wang vd. 2019).

Piroptozis, tümör baskılama işlevi uygular ve anti-tümör bağışıklık tepkilerini uyandırır. Kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedavi ve bağışıklık tedavisi dahil olmak üzere terapötik rejimler, kanserde lokal ve sistemik anti-tümör bağışıklığını güçlendiren piroptozu indükler. Öte yandan, normal hücrelerin piroptozisi, anti-kanser tedavilerinin yan etkilerine atfedilir (Zhao vd. 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle Ortamı (DMEM, Sigma), MGM-4 Melanosit Büyüme Besiyeri-4 Bullet Kit (MGM-4, Lonza), Fetal Sığır Serum (FBS, Biological Industries), Penisilin / Streptomisin (Biowest), Tripsin-EDTA (Biological Industries), Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS, Capricorn Scientific), Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma), TRI Reagent (Sigma), Tripan mavi boyası (Biorad), Usnik asit (Santa Cruz Biotechnology), Kloroform (MERCK), İzopropanol (EMSURE), Etanol (MERCK), SYBR Green (Roche).

3.1.2 Sarf malzemeler

T25 ve T75 Hücre kültürü flaskı (SARSTEDT), Kriyovial tüp (SARSTEDT), Steril PCR tüp (Greiner Bio-One), Steril falkon tüp (SARSTEDT), Steril serelojik pipetler (JET BİOFİL), Steril filtreli pipet uçları (BioPointe Scientific), 96 ve 6 kuyulu düz tabanlı steril plaka (SARSTEDT), 96 kuyucuklu plaka (ROCHE), PVDF membran (Thermo Fisher Scientific), Hücre kazıyıcı (SARSTEDT), Filtre kağıdı (Biorad).

3.1.3 Kitler

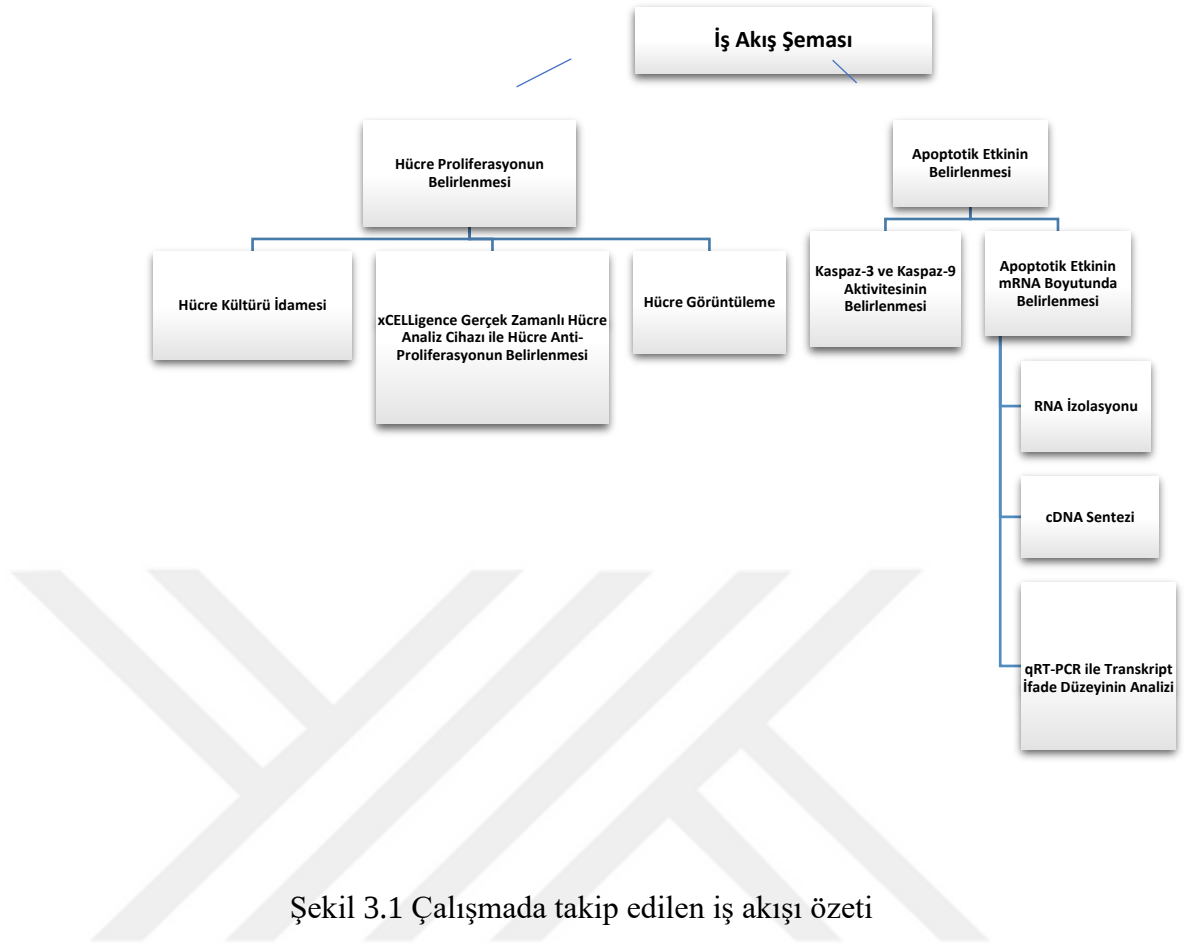
RT Profiler PCR Array – Human Apoptosis (Cat. no. 330231 PAHS-012ZA, Qiagen) cDNA Sentez Kiti (Biorad), SYBR Green Master Mix (Biorad), Kaspaz-3 kolorimetrik kit (Sigma, Cat. No: CASP3C-1KT), Kaspaz-9 kolorimetrik kit (Elabscience, Cat.No.:E-CK-A313)

3.1.4 Cihazlar

TC20 otomatik hücre sayıcı (Bio-Rad), xCELLigence RTCA S16 (ACEA Biosciences), Laminar flow kabin (Holten LaminAir Model 1,8), Mikroskop (Leica DCF290), Su banyosu (Lab-Line Aquabath), Otomatik pipetler 10 µl, 20 µl, 100µl, 200 µl, 1000µl (Gilson), Santrifüj (Hettich Zentrifugen Rotina 35R), CO₂ İnkübatör (Sanyo CO2 Incubator), Sıvı azot tankı (STATEBOURNE cryogenics), Real Time PCR (Roche Light Cycler 480), Shaker (Finepcr Orbital Shaker SH30), Saf su cihazı (Millipore Synergy, 185), Nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer), Infinite M Plex (Tecan), Kırık buz makinası (Scotsman), Terazı (Shimadzu AX200), Isı bloğu (Major Science).

3.2 Yöntem

Gerçekleştirilen tez çalışmasında önemli bir liken sekonder metaboliti olan Usnik asit uygulanmış insan deri maling Melonom'dan türetilen hücre hattı A-375 ve insan epidermal melanosit hücrelerinin proliferasyonu belirlenmiş ve usnik asitin apoptotik etkisi detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Çalışmada takip edilen iş akışı şekil 3.1'de özetlenmiştir.



3.2.1 Hücre kültürü idamesi

3.2.1.1 Hücrelerin büyüme şartları

İnsan deri malign melanomdan türetilen A-375 hücre hattının (ATCC No. CRL-1619) büyümesi ve çoğaltılması için, %10 FBS, %1 penisilin / streptomisin içeren DMEM yüksek glukoz besiyeri (Sigma, Katalog No. D6429) kullanılmıştır. İnsan epidermal melanosit hücre hattının (Lonza) büyümesi ve çoğaltılması için MGM-4 Melanosit Büyüme Besiyeri-4 Bullet Kit (Lonza, Katalog No. CC-3249) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Tez kapsamında kullanılan hücreler, katalog numaraları ve kullanılan besiyeri içerikleri

Hücre	Hücre Katalog Numarası	Hücre için kullanılan besiyeri içeriği
A-375 (İnsan deri malign melanomdan türetilen hücre hattı)	Kat No. CRL-1619	DMEM yüksek glukoz+%10 FBS, %1 Penisilin / Streptomisin
NHEM-Ad (İnsan epidermal melanosit hücre hattı)	Kat No. CC-2586	MGM-4 Bullet Kit

3.2.1.2 Hücre açılması ve besiyerinin değiştirilmesi

Sıvı azot tankından çıkarılan hücrelerin su banyosunda 1-2 dk çözülmesi beklenmiştir ve daha sonra 5 ml uygun besiyeri bulunan 15 ml'lik falkona aktarılmıştır. Hücre eklenmiş 15 ml'lik falkon 1500 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilerek hücreler pellet olarak çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası oluşan süpematant kısmı atılmış ve pelet 5 ml taze besiyerinde çözülmüştür. 5 ml taze uygun besiyerinde çözülen hücreler T25'lik flaska alınmıştır. Hücrelerin homojenliği mikroskopta kontrol edildikten sonra flask 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin morfolojik yapıları, canlılıkları ve kültür ortamı her gün mikroskop ile takip edilmiştir. Her iki günde bir hücrelerin besiyerleri değiştirilmiştir ve 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.1.3 Hücre pasajlanması

%80-90 oranında doygunluğa ulaşan hücreler pasaj aşaması için laminar kabin içine alınmıştır. Flaskta bulunan besiyeri atıldıktan sonra 4 ml PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve PBS uzaklaştırılmıştır. Flaska 1 ml Tripsin-EDTA eklenmiş ve 1-2 dk inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra 4 ml uygun besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hücreler 15ml'lik falkona alınmış ve tripsinin uzaklaştırılması için 1500 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj yapılmıştır. Ardından süpematant uzaklaştırılmış ve pelet 5 ml taze uygun

besiyeriyle çözülmüştür. Çözülen hücreler iki ayrı T25'lik flaska eşit olarak dağıtılmış ve üzerine 2.5 ml taze besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Flask 37 °C, %5 CO₂ şartlarda inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.4 Hücre dondurulma ve saklanması

Dondurma ortamı %10 DMSO ve %90 FBS kullanılarak taze olarak hazırlanmıştır. %80-90 doygunluğa ulaşan dondurulacak hücreler laminar kabin içerisine alınmıştır. Flasktaki besiyeri çekilip atılmış ve 4 ml PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. PBS uzaklaştırıldıktan sonra flaska 1 ml Tripsin-EDTA eklenmiş ve 1-2 dk inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra 4 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hücreler 15 ml'lik falkona alınmış ve tripsinin uzaklaştırılması için 1500 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj yapılmıştır. Takiben süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet halindeki hücreler 1 ml dondurma ortamında çözülmüştür. Dondurma ortamında çözülen hücreler krovial tüpe alınmıştır. Krovial tüp ilk olarak -20 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Ardından -80 °C'de 24 saat tutularak kademeli bir şekilde hücre dondurma süreci gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin uzun süre muhafaza edilmesi için son olarak krovial tüp sıvı azot tankına geçirilmiştir.

3.2.1.5 Hücre sayımı

Hücre sayımı işlemi TC20 otomatik hücre sayıcı ile gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı aşaması için ilk olarak sayım slaytının ilk haznesine 10 µl hücre süspansiyonu yüklenmiştir. Hücre canlılığını belirlemek için Tripan mavi boyası kullanılmıştır. 10 µl tripan mavi boyası ve 10 µl hücre süspansiyonu bir ependorf tüp içerisinde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Sayım slaytının diğer haznesine bu karışımdan 10 µl yüklenmiştir. Sayım slaytlarına yükleme yapıldıktan hemen sonra sayma işlemine geçilmiştir. Bunun için sayım slaytları TC20 otomatik hücre sayıcının slayt yuvasına yerleştirilmiş ve sayım alınmıştır. Her bir sayı 3 tekrarlı yapıp ortalama hücre sayısı alınmıştır.

3.2.2 Usnik asitin hazırlanması

Deneylerde kullanılacak ilaç adayı molekülü olan Usnik Asit (Santa Cruz Biotechnology) üretici firma tarafından temin edilmiştir. DMSO (%0.05) ile usnik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra usnik asit stok çözeltisi uygun besiyerleri ile dilüsyon işlemi yapılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. A-375 hücreleri ve insan epidermal melanosit hücreleri için 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ M konsantrasyonları ileri denemeler için kullanılmıştır.

3.2.3 xCELLigence RTCA ile hücre anti-proliferasyonunun belirlenmesi

Hücre anti-proliferasyonu belirleme deneyi xCELLigence RTCA analizi ile gerçekleştirilmiştir. Deneye başlamak için ilk önce xCELLigence RTCA S16 aleti inkübatör içine yerleştirilmiştir. 16 kuyulu e-plate'de her bir kuyuya hücre hatları için uygun olan besiyerinden 100 μ l eklenerek normalizasyon aşamasını gerçekleştirmek amacıyla ölçüm alınmıştır. Daha sonra 16 kuyulu e-plate cihazdan çıkarılmış ve laminal flow içerisinde A-375 ve insan epidermal melanosit hücrelerinin, kuyu başına 1×10^4 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan hücrelerin e-plate tabanına yerleşmesi için laminal flow içerisinde yarım saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda e-plate tekrar inkübatör içinde bulunan xCELLigence RTCA S16 aletine yerleştirilmiştir. Ölçüm aralığı 30 dk ve toplam analiz süresi 120 saat olacak şekilde parametreler girilmiş ve program çalıştırılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra cihaz durdurulmuş ve 16 kuyulu e-plate inkübatörde bulunan xCELLigence RTCA S16 aletinden çıkarılmıştır. Çıkarılan e-plate'in her bir kuyusundan 100 μ l besiyeri çekilip atılmıştır. A-375 hücreleri ve insan epidermal melanosit hücreleri için ise 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarında usnik asit ilave edilmiştir. Kontrol olarak da her iki hücre hattı için uygun besiyeri kullanılmıştır. Uygulama aşamasından sonra e-plate inkübatör içindeki xCELLigence RTCA S16 aletine tekrar yerleştirilmiş ve program ölçüme devam edilmesi için tekrar çalıştırılmıştır. Cihaz ekranından ölçümler ve grafik sonuçları takip edilmiştir. IC_{50} değerlerini ve zamanı hesaplamak için RTCA Software Lite yazılımı kullanılmıştır.



Şekil 3.2 xCELLigence RTCA S16 cihazı

3.2.4 Hücre görüntüleme

Hücre görüntüleme deneyi için hücreler T25 flaska 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra gece boyunca kültürlenmiş ve 24 saat sonra belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda usnik asit ile muamele edilmiştir. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonu için belirlenen zaman aralığı boyunca canlı hücre görüntüleri Invert Mikroskop (TMS Nikon) kullanılarak alınmıştır.

3.2.5 Apoptotik etkinin enzim seviyesinde belirlenmesi

3.2.5.1 Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi

Kaspaz-3 kolorimetrik kiti kullanılarak Kaspaz aktivitesi belirlenmiştir. Kaspaz-3 kolorimetrik kit içeriğinde Kaspaz-3 Ac-DEVD-pNASubstrat, 5x Lizis Tamponu, 10x Reaksiyon Tamponu, p-Nitroanilin Standart, Ac-DEVD-CHO İnhibitör ve su bulunmaktadır. Hücreler 6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 5×10^5 hücre sayısında ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda usnik asit hücrelere muamele edilmiş ve belirlenen saat hücre kültürü şartlarında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyular 1 ml PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 50 μ l soğutulmuş lizis tamponu ile buz üzerinde hücreler kazınmıştır. Kazınan hücreler

ependorf tüplere alınarak 15-20 dk buz üzerinde inkübe edilmiş ve 15 dk 17000 g'de +4 °C'de santrifüj yapılmıştır. Oluşan süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Kaspaz-3 aktivitesinin 96 kuyulu plakada ölçülmesi için reaksiyon şeması

	Hücre Lizatı (µl)	Kaspaz-3 5 µg/ml (µl)	1x Reaksiyon Tamponu (µl)	Kaspaz-3 İnhibitör Ac-DEVD- CHO 200 µM (µl)	Kaspaz-3 Substrat Ac- DEVD- pNA 2 mM (µl)
Blank	-	-	90	-	10
Apoptoz için uyarılmamış hücreler	5	-	85	-	10
Apoptoz için uyarılmamış hücreler+ inhibitör	5	-	75	10	10
Apoptoz için uyarılmış hücreler	5	-	85	-	10
Apoptoz için uyarılmış hücreler+ inhibitör	5	-	75	10	10
Kaspaz-3 pozitif kontrol	-	5	85	-	10
Kaspaz-3 pozitif kontrol+inhibitör	-	5	75	10	10

Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi 96 kuyulu plakada uygun kuyulara 5 µl hücre lizatı veya Kaspaz-3 pozitif kontrol yerleştirilmiştir. Kuyuların her birine 1x reaksiyon tamponu eklenmiştir. Uygun kuyucuklara Kaspaz-3 inhibitörü eklenmiştir. Her kuyucuğa kaspaz-3 substratı ekleyerek yavaşça karıştırıldıktan sonra analiz başlatılmıştır. Plaka kapatıldıktan sonra 37 °C'de 70 ila 90 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plakanın 405 nm dalga boyunda 3 tekrarlı ölçümü alınmıştır.

3.2.5.2 Kaspaz-9 aktivitesinin belirlenmesi

Kaspaz-9 kolorimetrik kiti kullanılarak Kaspaz aktivitesi belirlenmiştir.

Lizis çalışma solüsyonunun hazırlanması: İlk olarak kit içeriğinde bulunan lizis solüsyonu (E-CK-A313A) el ile karıştırılmış ve buzun üzerine alınmıştır. Ardından yeni bir eppendorf tüp içerisinde örnek başına 50 µL lizis solüsyonu yine kitin içerisinde çıkan 0.5 µL DTT ile karıştırılmış ve tüp tekrar buzun üzerine alınmıştır.

Örneklerin hazırlanması: Belirlenen IC50 konsantrasyonunda usnik asit hücrelere muamele edilmiş ve süspansiyon 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından uygun hacimde PBS eklenip, hücreler sayıldıktan sonra süspansiyon tekrar 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Takiben her 2 milyon hücre için 50 µL soğuk lizis çalışma solüsyonu eklenmiş ve hücreler resuspense edilmiştir. Tüpler arada 3-4 kez çalkalanmak suretiyle 30 dk buz banyosunda inkübe edilmiştir. Ardından 12000 rpm 15 dk +4 C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant test için yeni bir tüpe alınmıştır.

Kaspaz-9 aktivitesinin belirlenmesi aşaması:

1. Ac-LEHD-pNA[E-CK-A313C] ve 2 ×Reaksiyon Buffer [E-CK-A313B] kutudan çıkarılmış ve tamamen çözüldükten sonra kullanılıncaya dek buz üzerinde bekletilmiştir.
2. 2x reaksiyon çalışma solüsyonunun hazırlanması için her 50 µL 2 ×Reaksiyon Buffer [E-CK-A313B] için 0.5 µL DTT [E-CK-A313D] ilave edilmiştir.
3. Daha önce hazırlanan örneklerden 45 µL lizat alınmış ve yeni bir tüpte üzerine µL lizis solüsyonu eklenmiştir. Ardından çizelge 3.3'te belirtildiği gibi reaksiyon tüpleri hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3 Kaspaz-9 aktivitesinin ölçülmesi için reaksiyon şeması

	Blank tüp	Örnek tüpü
2x reaksiyon çalışma solusyonu	50 µL	50 µL
Lizis çalışma solusyonu	45 µL	0 µL
Örnek	0 µL	45 µL
Ac-LEHD-pNA	5 µL	5 µL
Toplam	100 µL	100 µL

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan ölçüm tüpleri 37 C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Ardından örneklerin plate okuyucuda 405 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür ve aşağıda belirtilen formül aracılığıyla kaspaz 9 aktiviteleri hesaplanmıştır.

$$\text{Kaspaz 9 aktivitesi} = (\text{OD}_{\text{örnek}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / (\text{OD}_{\text{negatif kontrol}} - \text{OD}_{\text{blank}})$$

3.2.6 Apoptotik etkinin mRNA seviyesinde belirlenmesi

3.2.6.1 RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için hücrelerin 6 kuyulu plakalara kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda usnik asit hücrelere muamele edilmiştir. Usnik asit muamelesinden IC_{50} konsantrasyonunda belirlenen saat sonrası kuyulardaki besiyerleri atılmış ve daha sonra kuyular PBS ile yıkanmıştır. Kuyulardaki hücrelere 1 ml Trizol eklenerek hücreler ependorf tüpe alınmıştır. Trizol içeren hücrelere 200 µl kloroform eklenmiş ve tüpler hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk bekletilmiştir. Tüpler +4 °C’de 12.000 rpm’de 13-15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda berrak faz yeni bir ependorf tüpüne alınmıştır. Tüplere 500 µl izopropanol eklenmiş ve tüpler 1 dk kadar hafifçe çalkalanmıştır. 10 dk beklemenin ardında tüplere +4 °C’de 12.000 rpm’de 8 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında izopropanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüplere 1 ml %75’lik etanol eklenmiş ve pellet kaldırılmıştır. +4 °C’de 5 dk 7500 rpm’de santrifüj edildikten sonra

dip kısımdaki pellete dikkat edilerek etanol uzaklaştırılmıştır. Tüpler kapağı açık şekilde kurumaya bırakılmış ve alkol uçtuktan sonra 35-50 µl RNAz serbest su eklenerek pellet çözülmüştür. İzole edilen RNAlar -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.6.2 cDNA sentezi

Biorad cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA’dan cDNA sentezi için 1000 ng kullanılmıştır. 1000 ng için kullanılması gereken µl miktarda total RNA, 5X NG cDNA Buffer (4 µl), Primer (1 µl), NG dART RT mix (1 µl) ve toplam hacim 20 µl’ye tamamlanacak şekilde Rnaz-free su tüpe eklenmiştir. Daha önceden 30-60 dk 35-65 °C sıcaklığa ayarlanmış PCR cihazına tüpler koyulmuştur. Reaksiyon 85 °C’de 5 dk tutularak bitirilmiş ve sentezlenen cDNA hemen -20 °C’ye kaldırılmıştır.

3.2.6.3 qRT-PCR ile transkript ifade düzeyinin analizi

Usnik asitin A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağındaki genlerin ifade düzeyleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-012Z) kullanılmıştır. Bu kapsamda apoptoz yolağında anahtar niteliğinde olan 84 adet genin transkripsiyon seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca bu çalışma verilerin normalizasyonunda kullanılmak üzere 5 adet housekeeping gen (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 ve RPLP0) içermektedir

Ticari olarak temin edilen RT² Profiler PCR plateler oda sıcaklığına çıkarılır ve kısa bir süre (10–15 s) santrifüjlenir. Aşağıda belirtildiği şekilde qRT-PCR kokteyli RT² Profiler PCR Array formatına bağlı olarak yükleme rezervuarında hazırlanır. Daha sonra çoklu pipet aracılığıyla RT² Profiler PCR Array içine dağıtılır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.4 qRT-PCR kokteyli bileşenleri

Array format	96-kuyu
2x SYBR® Green Mastermix	1350 µl
cDNA (500 ng/ul olacak şekilde ayarlanmış)	102 µl
RNase-free water	1248 µl
Total Hacim	2700 µl

Ardından plateler Roche LightCycler 480 cihazına yüklenir ve aşağıdaki döngü koşullarında reaksiyon başlatılır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.5 RT² Profiler PCR Array için Roche LightCycler 480 cihazında kullanılan PCR döngü koşulları

Döngü Adı	Döngü Tekrarı	Süre	Sıcaklık
Ön denaturasyon	1	10 dk	95 °C
PCR döngüsü	45	15 sn 1 dk	95 °C 60 °C (tek okuma)
Erime eğrisi analizi	1	15 sn -	60 °C 95 °C (sürekli okuma, 0.03°C artışlarla)

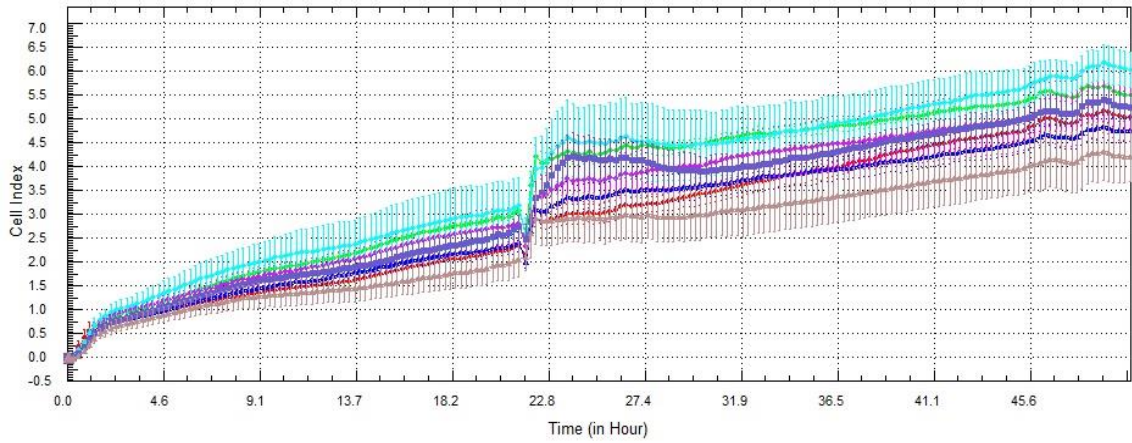
3.2.7 İstatistiksel analiz

qRT-PCR verilerinin normalizasyonu ve istatistiksel analizleri RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-012Z) üreticisinin talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır. Bu kapsamda verilerin analizi için RT² Profiler PCR Data Analysis (<https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>) programından yararlanılmıştır. Verilerin analizi üreticinin talimatları doğrultusunda belirtilen şekilde $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Usnik Asitin Melanosit Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

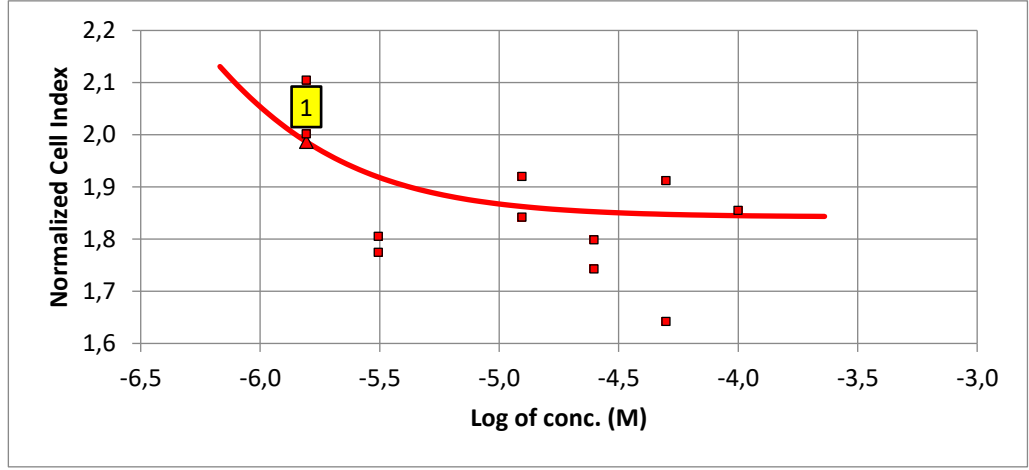
Bu bölümde xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA) sistemi aracılığıyla usnik asitin insan melanosit hücre hattı (normal hücre) üzerindeki sitotoksik etki potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda her biri insan melanosit hattından 5×10^3 hücre/ml içeren uygun besiyerleri usnik asitin 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 μM konsantrasyonları ile muamele edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Usnik asit ile (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0 ve 50.0 μM) muamele edilen insan melanosit hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre indeks grafiği

(Turkuaz: Besiyeri (kontrol); yeşil: 1.56 μM , pembe: 3.125 μM , mor: 6.25 μM , kırmızı: 12.5 μM , mor: 25 μM , kahve: 50 μM)

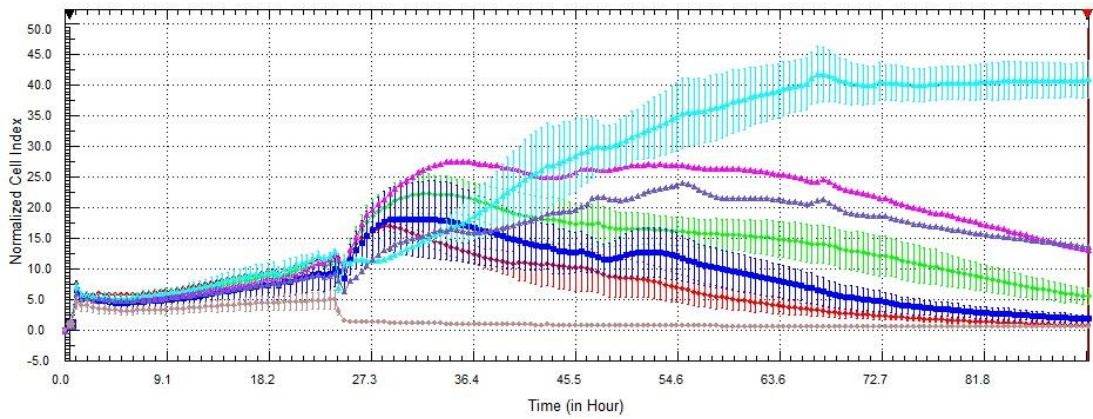
RTCA Software Lite yazılımı aracılığıyla insan melanosit hattı için IC_{50} değerinin 3.47 μM ve etkin saatin ise 11 saat olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Yapılan analiz sonucunda sadece 50 μM usnik asit konsantrasyonunun 74. saatte insan melanosit hücre hattı için sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2 Usnik asit muamele edilen insan melanosit hücre konsantrasyonlarının logaritmasına bağlı normalize edilmiş hücre indeksi

4.2 Usnik Asitin Anti-proliferatif Etkisinin Belirlenmesi

Bu bölümde xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA) sistemi aracılığıyla usnik asitin A-375 malign melanom hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etki potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda her biri A-375 malign melanom hücre hattından 2×10^3 hücre/ml içeren uygun besiyerleri usnik asitin 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 μM konsantrasyonları ile muamele edilmiştir (Şekil 4.3).

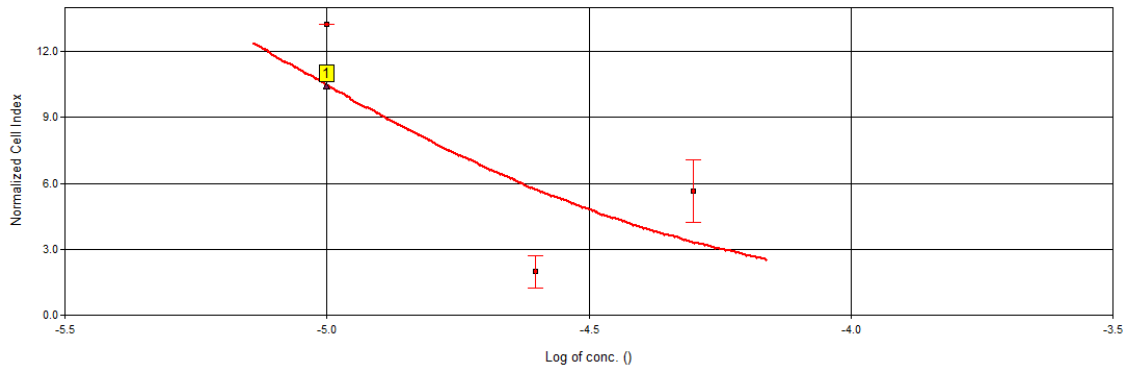


Şekil 4.3 Usnik asit ile (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0 ve 50.0 μM) muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre indeksi grafiği

(Turkuaz: Besiyeri (kontrol); yeşil: 1.56 μM , pembe: 3.125 μM , mor: 6.25 μM , kırmızı: 12.5 μM , mor: 25 μM , kahve: 50 μM)

RTCA Software Lite yazılımı aracılığıyla malign melanom hücre hattı için IC_{50} değerinin $20.0 \mu M$ ve etkin saatin ise 45.4 saat olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Yapılan analiz sonucunda sadece $50 \mu M$ usnik asit konsantrasyonunun 26. saatte A-375 malign melanom hücre hattı için sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Anti-proliferatif etkinin tespiti amacıyla analizlerin gerçekleştirildiği bu bölümde 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 μM konsantrasyonlardaki usnik asitin A-375 malign melanom hücrelerine anti-proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur.

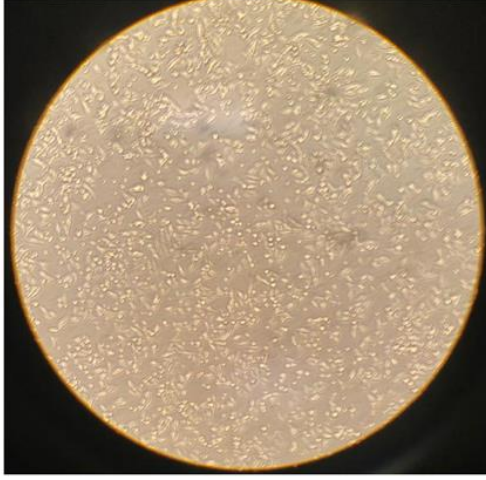


Şekil 4.4 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücre konsantrasyonlarının logaritmasına bağlı normalize edilmiş hücre indeksi

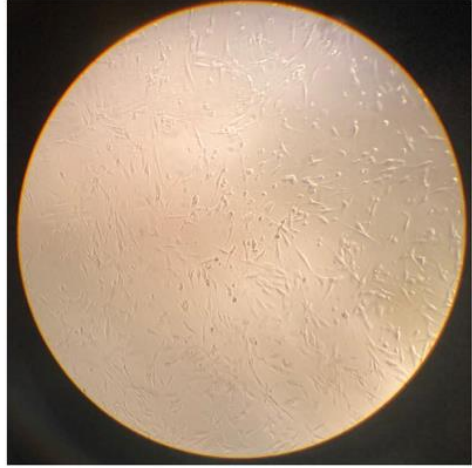
4.3 Hücre Görüntüleme

Malign melanom hücre hattı (A-375) ve melanosit hücre hattı daha önce belirlenen IC_{50} değerleri olan usnik asit konsantrasyonları ile belirlenen etkin saat süresince muamele edilmişlerdir. Bu IC_{50} değerleri A-375 hücreleri için $20 \mu M$ ve melanosit hücreleri için $3.47 \mu M$ 'dir. Etkin saatler ise A-375 hücreleri için 45.4 saat ve melanosit hücreleri için 11 saattir. Uygun besiyeri ortamında büyütülen hücreler ışık mikroskobu altında morfolojileri açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.5).

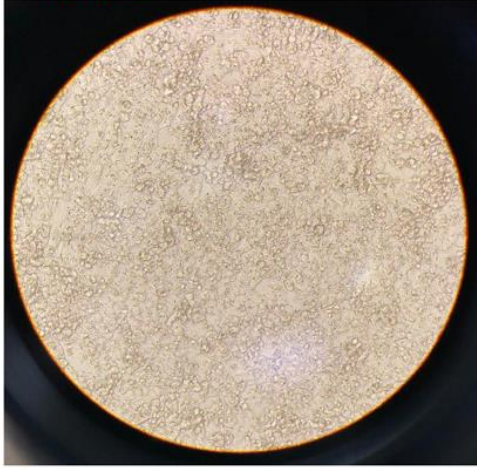
A. Melanosit



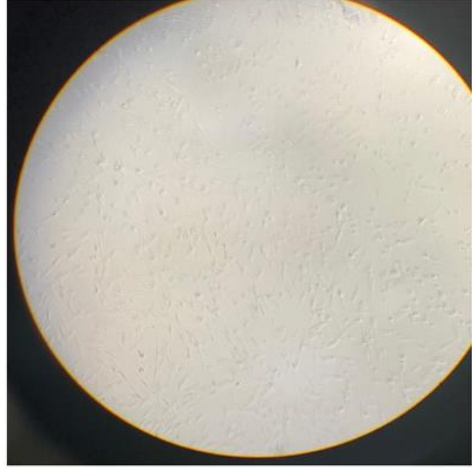
C. A-375



B. Melanosit + UA



D. A-375 + UA



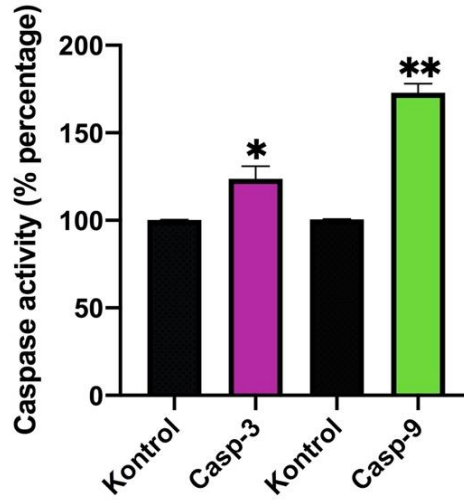
Şekil 4.5 Malign melanom hücreleri (A-375) ve melanosit hücrelerinin UA uygulaması öncesi ve sonrası invert mikroskop altındaki morfolojileri

UA uygulaması etkilerinin her iki hücre hattındaki etkilerinin hücre morfolojisi ve sayısı bakımından değerlendirilmesi halinde A-375 hücre yoğunluğunun UA muamelesi neticesinde kontrole göre azalış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Halbuki melanosit hücrelerinde UA muamelesi öncesi ve sonrasında gözlenen morfolojik değişikliklerin A-375'e nazaran daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).

4.4 Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında apoptozda önemli role sahip kaspazlardan olan Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 enzimlerinin aktivitelerinin tayininde kolorimetrik ölçüm prensibine dayalı olarak çalışan ticari bir kit kullanılmıştır.

Prensip olarak Kaspaz-3 enzimi vasıtasıyla asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilidin (Ac-DEVD-pNA)'in hidrolizasyonu ve takiben p-nitroanilin (pNA)'in salınımı gerçekleşir. Salınan bu son ürünün 405 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak ölçümü ile Kaspaz-3 enzim aktivitesi hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Bu kapsamda gerçekleştirilen analiz doğrultusunda Kaspaz-3 enziminin aktivitesinin kontrole göre yaklaşık 1,3 kat artış gösterdiği ve bu artışın istatistiki olarak anlam ifade ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Usnik asit ile muamele edilen A-375 malign melanom ve kontrol olarak kullanılan melanosit hücre hattında Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 enzimlerinin % aktivitesi

Kaspaz-9 aktivite tayini için kullanılan ticari kitin çalışma prensibi Kaspaz-9 dizisine özgü acetyl-Leu-Glu-His-Asp p-nitroanilide (Ac-LEHD-pNA) peptidinin sarı grup p-nitroaniline (pNA)'ne konjugasyonuna dayanmaktadır. Substratın Kaspaz-9 tarafından kesilmesi halinde, sarı grup pNA ayrılır ve 405 nm dalga boyunda ayrılan bu ürünler spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu sayede Kaspaz-9 aktivitesinin kolorimetrik

olarak belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu kapsamda gerçekleştirilen analiz doğrultusunda Kaspaz-9 enziminin aktivitesinin kontrole göre yaklaşık 1,75 kat artış gösterdiği ve bu artışın istatistiki olarak anlam ifade ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).

4.5 Apoptoz Yolağındaki Genlerin mRNA Seviyelerinin Tespiti

Usnik asitin A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağındaki genlerin ifade düzeyleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-012Z) kullanılmıştır. Bu kapsamda apoptoz yolağında anahtar niteliğinde olan 84 adet genin transkripsiyon seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca bu çalışma verilerin normalizasyonunda kullanılmak üzere 5 adet housekeeping gen (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 ve RPLP0) içermektedir. Çalışılan bu genlerin tamamına (84+5 adet) ilişkin bilgiler çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Apoptoz yolağındaki anahtar genleri içeren RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-012Z) in içeriğindeki genler hakkında bazı bilgiler

Plate pozisyonu	UniGene ID	GenBank ID	Gen Sembolü	Açıklama
A01	Hs.431048	NM_005157	ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
A02	Hs.424932	NM_004208	AIFM1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1
A03	Hs.525622	NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A04	Hs.728891	NM_001160	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
A05	Hs.370254	NM_004322	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
A06	Hs.377484	NM_004323	BAG1	BCL2-associated athanogene

Çizelge 4.1 Apoptoz yolağındaki anahtar genleri içeren RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-012Z) in içeriğindeki genler hakkında bazı bilgiler (devam)

A06	Hs.377484	NM_004323	BAG1	BCL2-associated athanogene
A07	Hs.523309	NM_004281	BAG3	BCL2-associated athanogene 3
A08	Hs.485139	NM_001188	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
A09	Hs.624291	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein
A10	Hs.193516	NM_003921	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
A11	Hs.150749	NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
A12	Hs.227817	NM_004049	BCL2A1	BCL2-related protein A1
B01	Hs.516966	NM_138578	BCL2L1	BCL2-like 1
B02	Hs.283672	NM_020396	BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
B03	Hs.469658	NM_006538	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
B04	Hs.410026	NM_004050	BCL2L2	BCL2-like 2
B05	Hs.435556	NM_016561	BFAR	Bifunctional apoptosis regulator
B06	Hs.591054	NM_001196	BID	BH3 interacting domain death agonist
B07	Hs.475055	NM_001197	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
B08	Hs.696238	NM_001166	BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2
B09	Hs.127799	NM_001165	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
B10	Hs.728893	NM_001168	BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
B11	Hs.150107	NM_016252	BIRC6	Baculoviral IAP repeat containing 6
B12	Hs.646490	NM_004330	BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
C01	Hs.144873	NM_004052	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
C02	Hs.131226	NM_004331	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
C03	Hs.550061	NM_004333	BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
C04	Hs.2490	NM_033292	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)

Çizelge 4.1 Apoptoz yolağındaki anahtar genleri içeren RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-012Z) in içeriğindeki genler hakkında bazı bilgiler (devam)

C05	Hs.5353	NM_001230	CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
C06	Hs.466057	NM_012114	CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
C07	Hs.368982	NM_032982	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
C08	Hs.141125	NM_004346	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
C09	Hs.138378	NM_001225	CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
C10	Hs.213327	NM_004347	CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
C11	Hs.654616	NM_032992	CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
C12	Hs.9216	NM_001227	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
D01	Hs.599762	NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
D02	Hs.329502	NM_001229	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
D03	Hs.355307	NM_001242	CD27	CD27 molecule
D04	Hs.472860	NM_001250	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
D05	Hs.592244	NM_000074	CD40LG	CD40 ligand
D06	Hs.501497	NM_001252	CD70	CD70 molecule
D07	Hs.390736	NM_003879	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
D08	Hs.249129	NM_001279	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a
D09	Hs.642693	NM_014430	CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b
D10	Hs.38533	NM_003805	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
D11	Hs.437060	NM_018947	CYCS	Cytochrome c, somatic
D12	Hs.380277	NM_004938	DAPK1	Death-associated protein kinase 1
E01	Hs.484782	NM_004401	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
E02	Hs.169611	NM_019887	DIABLO	Diablo, IAP-binding mitochondrial protein
E03	Hs.86131	NM_003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain

Çizelge 4.1 Apoptoz yolağındaki anahtar genleri içeren RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-012Z) in içeriğindeki genler hakkında bazı bilgiler (devam)

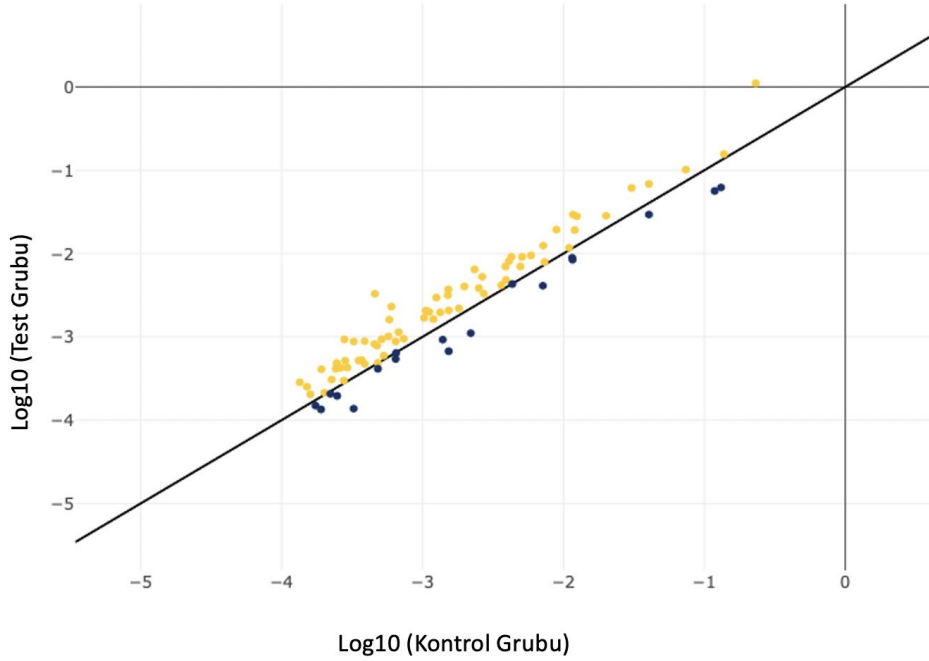
E04	Hs.244139	NM_000043	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
E05	Hs.2007	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
E06	Hs.80409	NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
E07	Hs.87247	NM_003806	HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
E08	Hs.643120	NM_000875	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
E09	Hs.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10
E10	Hs.36	NM_000595	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
E11	Hs.1116	NM_002342	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
E12	Hs.632486	NM_021960	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
F01	Hs.710305	NM_004536	NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
F02	Hs.654408	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
F03	Hs.405153	NM_006092	NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
F04	Hs.513667	NM_003946	NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
F05	Hs.499094	NM_013258	PYCARD	PYD and CARD domain containing
F06	Hs.103755	NM_003821	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
F07	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor
F08	Hs.591834	NM_003844	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
F09	Hs.521456	NM_003842	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
F10	Hs.81791	NM_002546	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
F11	Hs.279594	NM_001065	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A

Çizelge 4.1 Apoptoz yolağındaki anahtar genleri içeren RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-012Z) in içeriğindeki genler hakkında bazı bilgiler (devam)

F12	Hs.256278	NM_001066	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
G01	Hs.443577	NM_014452	TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
G02	Hs.462529	NM_003790	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
G03	Hs.654459	NM_001561	TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
G04	Hs.478275	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G05	Hs.654445	NM_001244	TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
G06	Hs.654481	NM_000546	TP53	Tumor protein p53
G07	Hs.523968	NM_005426	TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
G08	Hs.697294	NM_005427	TP73	Tumor protein p73
G09	Hs.460996	NM_003789	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
G10	Hs.522506	NM_021138	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
G11	Hs.510528	NM_003300	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
G12	Hs.356076	NM_001167	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0

Normalizasyon analizlerinde kullanılmak üzere çalışılan 5 adet housekeeping gen (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 ve RPLP0) için hem kontrol (A-375 malign melanom hücreleri) hem de test grubundan (usnik asit ile muamele edilmiş A-375 malign melanom hücreleri) elde edilen cq değerlerinin geometrik ortalaması hesaplanmıştır ve bu değer kontrol için 15,85 ve test grubu için 15,60 olarak bulunmuştur. Verilerin normalizasyonu bu geometrik ortalamalar üzerinden gerçekleştirilmiştir.

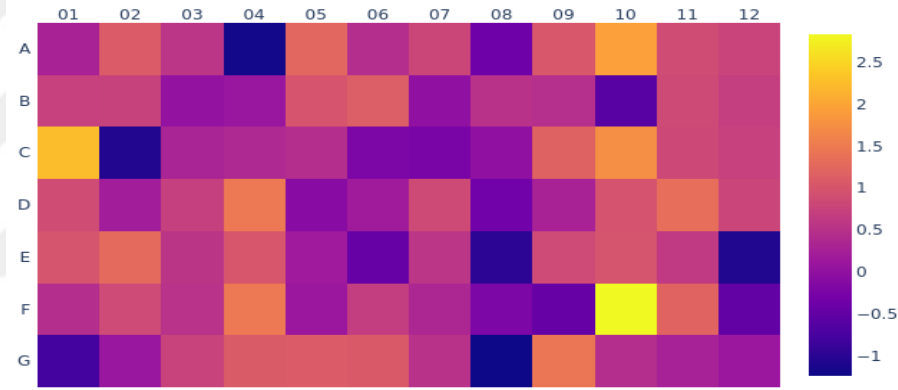
Apoptoz ile ilgili 84 adet genin test ve kontrol grubu arasında transkript seviyesindeki değişimlerinin incelendiği bu bölümde 66 adet genin ifade seviyesinin usnik asit muamelesi ile artış gösterdiği, 18 adet genin ise ifadesinin düştüğü gözlenmiştir (şekil 4.7).



şekil 4.7 Test ve kontrol grubu arasında ifadesi artan veya azalan genlerin sayısının gösterildiği saçılım diyagramı (scatter plot)

Sarı renk ile gösterilen noktalar test grubunda kontrol grubuna kıyasla ifadesi artan genleri göstermektedir. Siyah renk ile gösterilen noktalar ise test grubunda kontrol grubuna kıyasla ifadesi azalan genleri işaret etmektedir

Yukarıda verilmiş olan saçılım diyagramından (scatter plot) anlaşıldığı üzere apoptoz yolağında anahtar role sahip 84 adet genin büyük çoğunluğunun gen ifade seviyelerinde A-375 malign melanom hücrelerinde usnik asit muamelesi ile birlikte bir artış gözlenmiştir. Gen ifade seviyelerinde gözlenen bu farklılaşmanın hangi genlerde ve ne şekilde olduğunu gösteren Clustergram grafiği şekil 4.8’de gösterilmektedir.

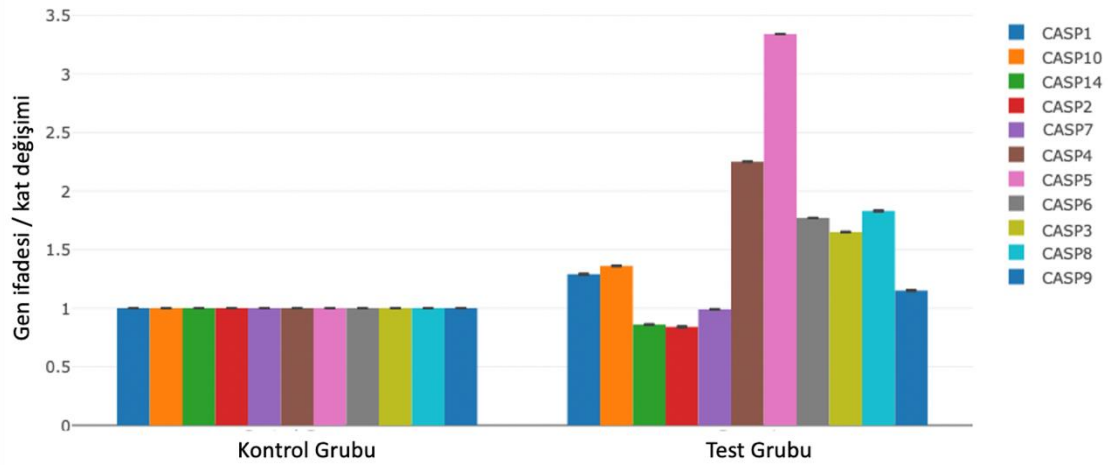


	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1 (1.21)	AIFM1 (2.13)	AKT1 (1.47)	APAF1 (-2.28)	BAD (2.36)	BAG1 (1.37)	BAG3 (1.73)	BAK1 (-1.29)	BAX (2.03)	BCL10 (3.84)	BCL2 (1.83)	BCL2A1 (1.69)
B	BCL2L1 (1.65)	BCL2L10 (1.66)	BCL2L11 (1.01)	BCL2L2 (1.06)	BFAR (1.99)	BID (2.17)	BIK (-1.01)	BIRC2 (1.41)	BIRC3 (1.38)	BIRC5 (-1.51)	BIRC6 (1.79)	BNIP2 (1.61)
C	BNIP3 (4.76)	BNIP3L (-2.1)	BRAF (1.23)	CASP1 (1.29)	CASP10 (1.36)	CASP14 (-1.16)	CASP2 (-1.19)	CASP7 (-1.01)	CASP4 (2.25)	CASP5 (3.34)	CASP6 (1.77)	CASP3 (1.65)
D	CASP8 (1.83)	CASP9 (1.15)	CD27 (1.62)	CD40 (2.77)	CD40LG (-1.07)	CD70 (1.13)	CFLAR (1.79)	CIDEA (-1.27)	CIDEB (1.21)	CRADD (1.96)	CYCS (2.51)	DAPK1 (1.71)
E	DFFA (1.97)	DIABLO (2.43)	FADD (1.46)	FAS (2.01)	FASLG (1.12)	GADD45A (-1.38)	HRK (1.47)	IGF1R (-1.99)	IL10 (1.8)	LTA (1.97)	LTBR (1.54)	MCL1 (-2.11)
F	NAIP (1.36)	NFKB1 (1.8)	NOD1 (1.42)	NOL3 (2.75)	PYCARD (1.08)	RIPK2 (1.59)	TNF (1.27)	TNFRSF10A (-1.16)	TNFRSF10B (-1.38)	TNFRSF11B (7.16)	TNFRSF1A (2.28)	TNFRSF1B (-1.41)
G	TNFRSF21 (-1.74)	TNFRSF25 (1.06)	TNFRSF9 (1.68)	TNFSF10 (2.11)	TNFSF8 (2.13)	TP53 (2.08)	TP53BP2 (1.41)	TP73 (-2.36)	TRADD (2.71)	TRAF2 (1.37)	TRAF3 (1.21)	XIAP (1.08)

Şekil 4.9 Genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası),

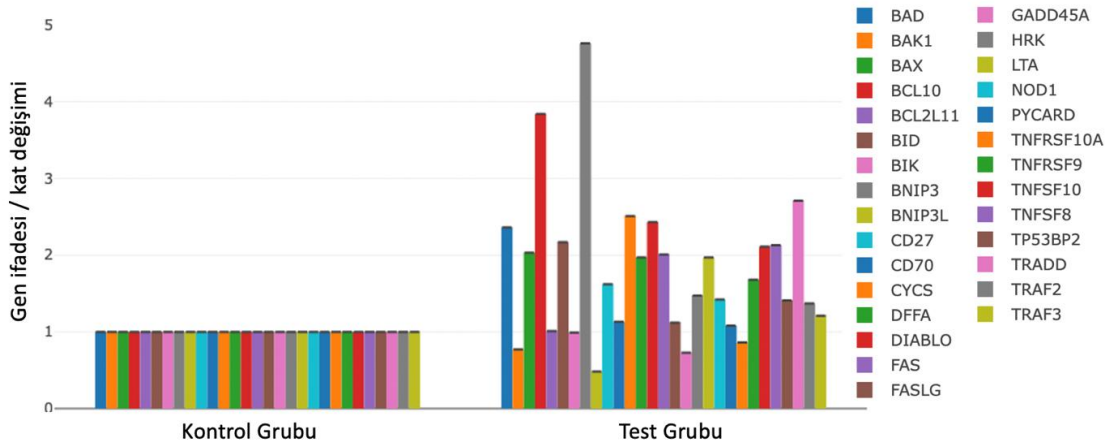
(A) Test ve kontrol grubu arasında ifadesi artan veya azalan genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası), (B) İlgili kuyulara karşılık gelen genler ve gen ifadesi kat değişimleri

Apoptoz sırasında çok önemli rolü olan sistein-proteaz grubu enzimlerden kaspaz gen ailesi üyelerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında, büyük çoğunluğunun usnik asit uygulanmış A-375 malign melanom hücresindeki gen ifadesinin kontrole göre artış gösterdiği görülmektedir. Kaspazlar arasında en fazla artış gösterenlerin sırasıyla kaspaz 5, kaspaz 4, kaspaz 8, kaspaz 6, ve kaspaz 3, kaspaz 10, kaspaz 1 ve kaspaz 9 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Test grubunda gen ifadesinde kontrole göre düşüş gözlenen kaspaz 14, kaspaz 7 ve kaspaz 2'deki düşüşler ise istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ve bu nedenle ifade seviyeleri değişmedi şeklinde yorumlanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde Kaspaz gen ailesi üyelerinin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi

Kaspazlar pro-apoptotik genler olup, kaspazlar haricinde bu çalışmada ele alınan diğer pro-apoptotik genlerde bulunmaktadır. Söz konusu bu genlere ilişkin RT-qPCR sonuçları şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde diğer pro-apoptotik gen ailesi üyelerinin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi

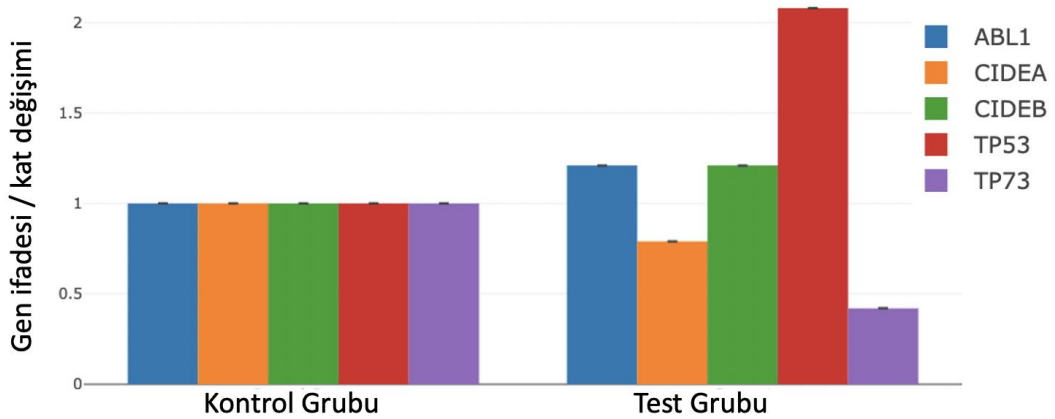
Kaspazlar hariç diğer pro-apoptotik genlerin ifade düzeyleri incelendiğinde ifadesi en fazla artış gösteren genin BNIP3 geni (4.76 kat) olduğu görülmektedir. Ardından en az 2 kat ve üzeri ifade artışı gösteren BCL10 (3.84 kat), TRADD (2.71 kat), CYCS (2.51 kat), DIABLO (2.43 kat), BAD (2.36 kat), BID (2.17), TNFSF8 (2.13 kat), TNFSF10 (2.11 kat), BAX (2.03 kat) ve FAS (2.01 kat) genleri gelmektedir (Şekil 4.9). Diğer taraftan gen ifadesinde düşüş gözlenen BAK1, BNIP3L, GADD45A ve TNFRSF10A genleri arasında sadece BNIP3L genindeki düşüşün anlamlı ifade ettiği saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.9-4.11).

Apoptoz yolağında ölüm domaini reseptörleri oldukça önemli bir role sahiptir ve ölüm alanı olarak adlandırılan (DD) yaklaşık 80 amino asit uzunluğunda bir bölge ihtiva ederler. Ligand ile aktif hale gelmeleriyle birlikte hücre ölümüne aracılık eden çeşitli proteinleri devreye sokarlar. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında pro-apoptotik özelliğe sahip dört adet ölüm domaini reseptörünün gen ifade seviyeleri incelenmiştir (Şekil 4.12). Test grubunda kontrol grubuna kıyasla CRADD, FADD ve TNF ölüm domaini reseptör genlerinin ifade seviyelerinin anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p < 0.05$). Diğer taraftan TNFRSF10B gen ifade seviyesinin kontrole göre düşüş sergilediği fakat bu düşüşün anlam ifade etmediği anlaşılmıştır ($p < 0.05$).



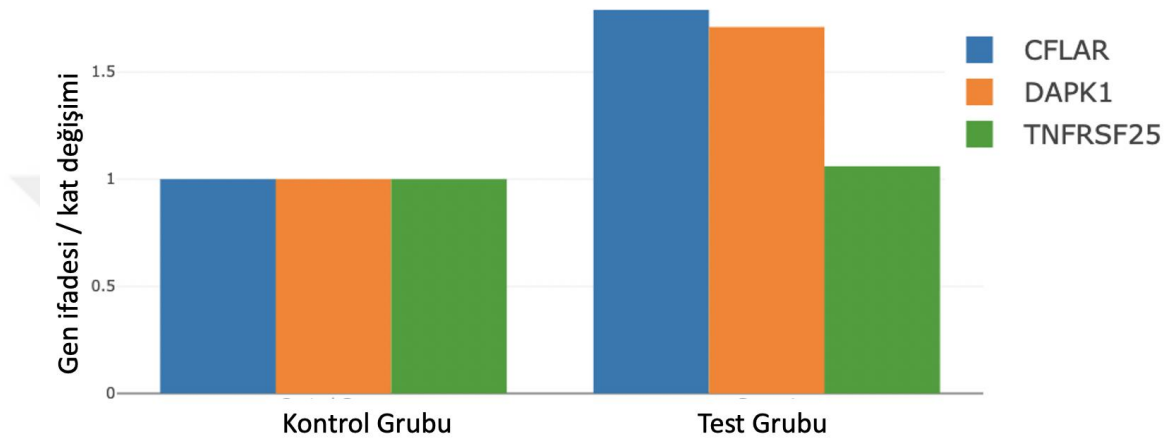
Şekil 4.12 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde ölüm domaini reseptörü kodlayan genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi

Apoptoz yolağındaki anahtar genlerden bazıları DNA hasarı ve tamiri ile ilişkilidir. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında söz konusu bu genlerden en önemli 5 tanesinin gen ifade seviyeleri analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.13’de sunulmuştur. Çalışılan genlerin 3 tanesinin ifadesinde artış olduğu ve en fazla artışı gösteren genin TP53 (2.08 kat) olduğu belirlenmiştir. CIDEA ve TP73 genlerinin ifade seviyesinin kontrole göre düşüş sergilediği fakat sadece TP73’teki düşüş anlamlı görülmektedir ($p < 0.05$) (Şekil 4.13).



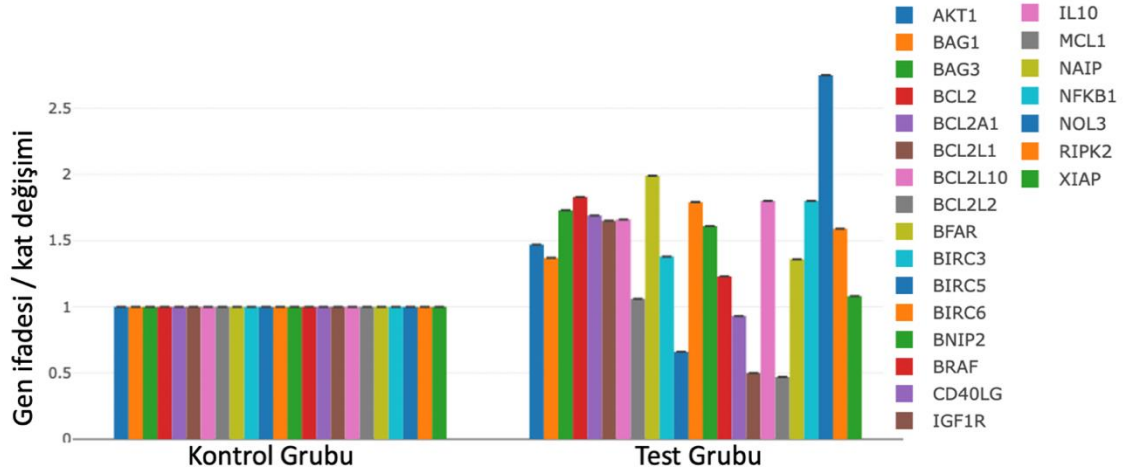
Şekil 4.13 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağında DNA hasarı ve tamiri ile ilgili genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında test ve kontrol grubu arasında hücre dışı apoptotik sinyallerden sorumlu olan CFLAR (CASPER), DAPK1 ve TNFRSF25 (DR3) genlerin ifade profilleri de çalışılmıştır (Şekil 4.14). Görüldüğü üzere her üç genin de ifade profili kontrolün üzerinde seyrederken TNFRSF25 genindeki artış istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. CFLAR (1.79 kat) ve DAPK1 (1.71 kat) artış seviyeleri ise anlamlıdır ($p<0.05$) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağında hücre dışı apoptotik sinyallerden sorumlu genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi

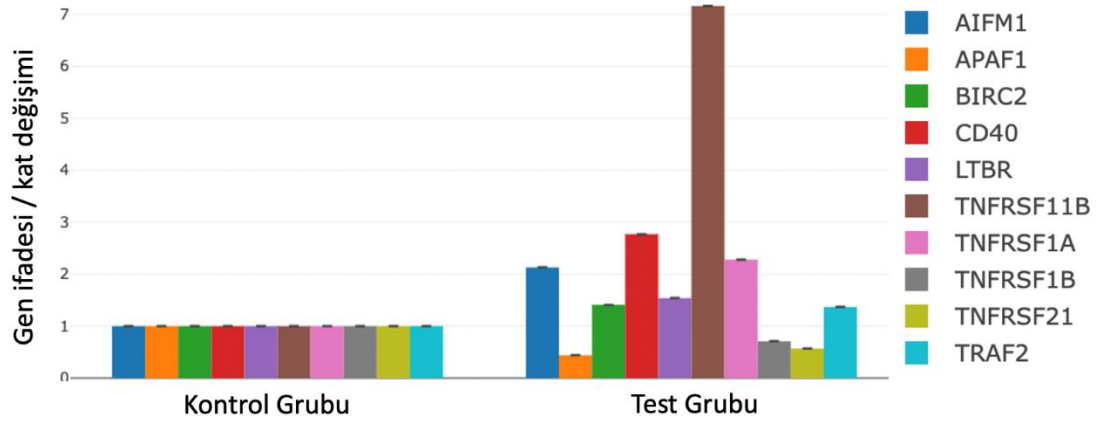
Buraya kadar bahsedilen ve ilgili veriler sunulan apoptotik genlerin tamamı apoptozu indükleyen genlerdir. Bu noktada ise anti-apoptotik genler ele alınacaktır. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında apoptoz yolağında rolü olan anti-apoptotik genlerden 23 tanesi çalışılmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağında anti-apoptotik olarak çalışan genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi

Apoptoz yolağında anti-apoptotik role sahip bu genlerin ifadeleri incelendiğinde 23 adet gen arasından 12 tanesinde test grubunda kontrole kıyasla tespit edilen gen ifadesi artışının 1.5 kat ve üzeri olduğu ve anlam ifade ettiği görülmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 4.13). Bahsi geçen bu genler NOL3 (2.75 kat), BFAR (1.99 kat), BCL2 (1.83 kat), IL10 (1.80 kat), NFKB1 (1.80 kat), BIRC6 (1.79 kat), BAG3 (1.73 kat), BCL2A1 (1.69 kat), BCL2L10 (1.66 kat), BCL2L1 (1.65 kat), BNIP2 (1.61 kat) ve RIPK (1.59 kat) dır. İfadesinde düşüş gözlenen genler BIRC5, IGF1R ve MCL1 olup bu düşüşler anlamlıdır ($p < 0.05$) (Şekil 4.15).

Çalışılan PCR panelinde yer alan ancak panel üreticisi tarafından yukarıdaki kategorilere dahil edilmemiş olan, apoptoz ile ilişkili diğer bazı genlerin ifade seviyeleri de incelenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.16 Usnik asit muamele edilen A-375 malign melanom hücrelerinde apoptoz yolağında panel üreticisi tarafından verilen kategorilere dahil edilmemiş olan, apoptoz ile ilişkili diğer bazı genlerin ifadelerinde kontrole kıyasla gözlenen kat değişimi

Şekil 4.16’da verilen genler arasında test grubunda kontrole kıyasla en fazla artışı, 1.5 kat ve üzeri, gösteren genler TNFRSF11B (7.16 kat), CD40 (2.77 kat), TNFRSF1A (2.28 kat), AIFM1 (2.13 kat) ve LTBR (1.54) genleridir. Azalış gösteren genler ise APAF1, TNFRSF21 ve TNFRSF1B genleridir ve sadece ilk ikisindeki düşüş anlamlıdır ($p < 0.05$) (Şekil 4.14).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Melanom en ölümcül cilt kanseri türüdür ve insidansı diğer önlenebilir kanserlere göre daha hızlı bir artış göstermektedir (Leiter vd. 2014). Hücrelerdeki foto-koruyucu pigment melanini sentezleyen melanositlerin malign hücrelere dönüşümünden kaynaklanır (Shorfuzzaman 2022). Melanom, gözdeki pigment üreten hücrelerden, gastrointestinal sistemden, cinsel organlardan, sinüslerden ve beyin zarlarından kaynaklanabilir, ancak en yaygın olarak ultraviyole (UV) hasarı durumunda ciltte görülür. Melanom için kullanılan tedavi yöntemleri arasında topikal tedavi, sentinel lenf nodu biyopsisi veya cerrahi, adjuvan tedavi, cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler yer almaktadır. Melanom hücreleri geleneksel kemoterapötik ilaçlara karşı dirençlidir, bu nedenle yeni moleküllerin terapötik etkinliğinin araştırılması kanser araştırmalarında önemli bir hedef haline gelmiştir (Yangın vd. 2022).

Liken türleri uzun yıllardır tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Cragg ve Newman 2013, Marcano 1991, Sepahvand vd. 2021). Liken cinslerinden biri olan *Usnea Adans.* enfeksiyon, dermatoz, tüberküloz ve pnömoni gibi birçok hastalığın tedavisinde halk ilacı olarak kullanılmaktadır (Marcano vd. 1991, Sepahvand vd. 2021). Son araştırmalar sekonder metabolitlerinin benzersiz özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde fitokimyasallar olarak likenlerin terapötik potansiyeline odaklanmıştır (Solárová vd. 2020).

Usnik asit (UA), *Usnea Adans.*, *Alectoria Ach.* ve *Ramalina Ach.* cinsinin en önemli sekonder metabolitlerinden biridir. UA kullanımı, anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-inflamatuar, antioksidan, iyileştirici ve anti-kanser aktiviteleri nedeniyle tıpta büyük ilgi görmüştür (Solárová vd. 2020, Kwong vd. 2021). UA'nın anti-proliferatif etkileri mide, hepatoselüler, akciğer, meme, prostat vb. farklı kanser türlerinde araştırılmıştır (Yang vd. 2016, Eryılmaz vd. 2018, Kumar vd. 2020). Bu çalışmalarda etkili konsantrasyonlar, anjiyogenezin inhibisyonu, UA tarafından invazyon ve migrasyon, hücre ölüm tipi ve moleküler sinyal yolları kanser hücrelerinin tip ve özellikleri açısından farklılık göstermektedir (Yurdacan vd. 2019).

Melanom ilerlemesi, kanser hücresinin hücre ölüm yollarını düzenleme, immün sürveyanstan kaçınma ve elverişsiz bir mikro ortamda hayatta kalma yeteneğine bağlıdır (Huang vd. 2022). Apoptoz, kanser sürecinde hücrelerin hayatta kalmasını ve yayılmasını kısıtlayan doğal bariyer olarak tanımlanabilir. Diğer kanser hücreleri gibi, melanom hücreleri de programlanmış bir hücre ölüm mekanizması olan apoptoz yoluyla kendi kendini yok edebilir (Cheng ve Shuen-KueiLiao 2001). Apoptoz, çeşitli hücre işlemlerinin homeostazını sürdürme işlevi görür ve apoptotik yoldan kaçınma, tümör oluşumu ve melanom hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile ilişkilidir. Ayrıca, apoptoza hem başlatıcı hem de efektör proenzim olan kaspazlar aracılık eder ve bunların bir proteolitik kaskad salınımı sonuçta hücre ölümüyle sonuçlanır (Lopez-Bergami, Fitchman vd. 2008, Madhunapantula ve Robertson 2009).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, UA'nın A-375 malign melanom hattı üzerindeki potansiyel anti-kanser aktivitesi araştırılmıştır. Bu kapsamda UA'nın IC₅₀ değeri belirlendikten sonra A-375 hücrelerinde UA kaynaklı apoptozu belirlemek için apoptoz yolağında rol oynadığı bilinen 84 adet genin kantitatif RT-PCR analizi yapılmıştır. Ayrıca, UA'nın anti-anjiyojenik, anti-migrasyon ve anti-invazyon özellikleri de belirlenmiştir.

Günümüze dek usnik asit ve diğer birçok hücre hattı üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Aşağıda kronolojik olarak bu çalışmalardan bahsedilmiş ve elde edilen bulgular bu tez çalışmasından elde edilenler ile kıyaslanmıştır.

Usnik asitin kanser tedavisinde kullanılabileceğine dair ilk kanıtlar milattan sonra 970 yılına kadar dayanmaktadır. O dönemlerde dahi birçok ülkede geleneksel tıp alanında kullanımının olduğu bilinmektedir (Hartwell 1971). Amerikalı araştırmacılar Kupschan ve Kopperman (1975) tarafından likenden izole edilen usnik asitin farelerde tümör inhibitörü olabileceğinin bildirilmesi üzerine çalışmalar tekrar hız kazanmıştır (Kupschan ve Kopperman 1971).

Bačkorová vd. (2011) parietin, atranorin, usnik asit and gyrophoric asit gibi farklı liken bileşiklerinin kolon karsinomu üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Dokuz farklı hücre hattında gerçekleştirdikleri araştırmada çalışılan bu dört liken bileşiğinin de anti-proliferatif ve sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Bačkorová vd. 2011). Bačkorová vd. (2011)'nın sonuçları bizim bu tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgularla uyumludur. Ancak elde ettikleri IC₅₀ değerleri (143.1 µM-157.2 µM) bizim A-375 malign melanom hücreleri için elde ettiğimiz IC₅₀ değerinden (20.0 µM) en az 7 kat yüksektir.

Song vd. (2012) UA'nın tümör anjiyogenezi üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere Bcap-37 göğüs kanseri hücre hattı ile gerçekleştirdikleri çalışmada usnik asidin fare ksenograft tümör modelinde farelerin vücut ağırlığını etkilemeden Bcap-37 meme tümörü büyümesini ve anjiyogenezi baskıladığını bulmuşlardır. Ayrıca in vitro endotelial hücrelerde morfolojik değişiklikleri ve apoptozu indüklediğini belirlemişlerdir (Song vd. 2012). Elde etmiş oldukları bulgulara benzer şekilde bu tez çalışmasında usnik asidin insan A-375 malign melanom hücrelerinde morfolojik değişiklikleri ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.

Singh vd. (2013) tarafından usnik asitin insan akciğer karsinom hücreleri (A549) üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, UA'nın hücre büyümesini inhibe ettiği ve insan akciğer karsinomu hücrelerinde mitokondriyal membran depolarizasyonu ve apoptoz indüksiyonu yoluyla hücre ölümünü indüklediği belirtilmiştir (Singh vd. 2013). Benzer şekilde, gerçekleştirilen bu tez çalışmasından elde edilen bulgular UA'nın apoptoz mekanizmasında çok sayıda geni regüle etmek suretiyle apoptozu indüklediğini göstermektedir.

Millot vd. (2013) yılında *Leprocaulon microscopicum*'tan izole edilen usnik asit türevinin HT-29 insan kolon hücre hattı üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir ve IC₅₀ değerinin 55 µM olduğunu tespit etmişlerdir. İlaveten usnik asitin kolon kanseri hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisini belirlemişlerdir (Millot vd. 2013). Bizim bu tez çalışmasında insan A-375 malign melanom hücreleri için elde ettiğimiz IC₅₀ değeri de

(20 μ M) Millot vd. (2013) kolon hücre hattı için elde ettiğine kısmen benzer şekilde (55 μ M) düşük bulunmuştur.

Eryılmaz vd. (2018)'nin UA'nın meme (MCF7 hücre hattı) ve prostat kanseri (LNCaP) üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada, MCF7 için IC₅₀ değeri 71.4 μ M, LNCaP için ise 77.5 μ M olarak bulunmuştur. UA normal hücelere hasar vermeksizin apoptotik hücre ölümünü ve G0/G1 hücre döngüsünün durmasını indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar kanser hücrelerinde UA aracılı apoptozun altında yatan moleküler mekanizmanın çalışılması gerektiğini önermişlerdir (Eryılmaz vd. 2018). Eryılmaz ve vd. (2018)'nin UA'nın meme ve prostat kanseri üzerine etkileri ile ilgili elde ettikleri bulgular gerçekleştirilen bu tez çalışmasında malign melanom hücreleri için elde edilen bulgular ile uyumludur. Sadece biz bu çalışmada malign melanom hücreleri için daha düşük bir IC₅₀ değeri (20 μ M) elde etmiş bulunmaktayız ve önerildiği üzere bu tez çalışmasında apoptozun detaylı mekanizması üzerinde durulmuştur.

Geng vd. (2018) tarafından UA'nın iki farklı mide kanser hücre hattı üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada çalışılan BGC823 hücreleri için IC₅₀ değeri 236.55 $\pm$ 11.12 μ M, SGC7901 hücreleri için ise 618.82 $\times$ 1.77 μ M olarak tespit edilmiştir. Ayrıca UA uygulamasının mide kanser hücre hatlarında hücre döngüsünün durmasına ve otofajiye neden olduğu ve apoptoz ile ilgili proteinlerin ifadesini düzenleyerek apoptotik etki oluşturduğu ifade edilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında A-375 malign melanom hücreleri için elde edilen IC₅₀ değeri Geng vd. (2018)'nin çalışmasının aksine çok daha düşük bulunmuştur (20.0 μ M). Ancak benzer şekilde UA'nın apoptotik genlerin ifadelerini ciddi şekilde etkilediği saptanmıştır.

Kumar vd. (2020) UA'nın insan mide kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak UA'nın mide kanseri AGS ve SNU-1 hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiğini bulmuşlardır. UA'nın bizim bu çalışmamızdakine (bizde 20 μ M) yakın bir şekilde 10 μ M – 25 μ M konsantrasyonlarının etkin olduğunu belirlemişlerdir (Kumar vd. 2020). Yine bizim

çalışmamız ile paralel olarak UA'nın kaspaz aktivasyonunu, BAX:Bcl2 oranını ve mitokondriyal apoptozisi arttırdığı tespit edilmiştir.

Sun ve ark. (2021) UA'nın servikal kanser/rahim ağzı kanser hücrelerinde UA'nın etkilerine dair gerçekleştirdikleri bir çalışmada, UA'nın STAT3 ve RAS yollarını aşağı regüle ederek PD-L1 protein sentezini inhibe ettiği bulunmuştur. PD-L1'i aşağı regüle ederek sırasıyla hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi, göçü ve istilayı inhibe ettiği, böylece tümör büyümesini engellediği tespit edilmiştir (Sun vd. 2021). Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında UA'nın benzer şekilde A-375 malign melanom hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini tespit etmiş bulunmaktayız.

Çolak vd. (2022) UA'nın yumurtalık kanseri hücre hatlarındaki etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, OVCAR-3 hücreleri için UA'nın IC₅₀ değerinin 20 µM olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer bir şekilde, gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da A-375 hücreleri için tespit edilen UA IC₅₀ değeri 20 µM'dır. Diğer taraftan Çolak vd. (2022)'nin çalışmasında UA'nın yumurtalık kanser hücre büyümesini doz ve zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiğini ve programlı hücre ölümünü indüklediğini belirlenmiştir (Çolak vd. 2022). Bu sonuçlarda bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Petrová vd. (2022) çalışmalarında HUVEC (göbek kordonundan alınmış entotel hücre kökenli) hücrelerini VEGF ve bFGF ile uyararak anjiyogenezi teşvik etmişlerdir. Ardından bu hücelere farklı konsantrasyonlarda UA uygulamışlar ve UA'nın 33.57 µM'lık konsantrasyonunun hücrelerin proliferasyonunu, göçünü ve tüp oluşumunu engellediğini belirlemişlerdir. Transkript seviyesinde bulgular içermeyen bu çalışma ile UA'nın tümör hücrelerinin bir özelliği olan anjiyogenez potansiyelini engellediği çıkarımına varmışlardır (Petrová vd. 2022). Bu sonuçlar UA'nın kanser hücrelerin gelişimi ve ilerlemesini engellemesi özelinde bizim tez çalışmamızdan elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir.

Wu vd. (2022) UA'nın üç adet akciğer kanseri hattı (SPC-A-1, 95D ve SK-LU-1) üzerindeki etkilerine ilişkin bir çalışma gerçekleştirmişler ve 21–68 µM IC₅₀ değerleriyle

UA'nın akciğer kanserinin inhibe ettiğini belirlemişlerdir (Wu vd. 2022). Yüzeysel tasarlanan bu çalışmada akciğer kanseri için UA ile elde ettikleri IC₅₀ değeri (21–68 µM) bizim bu tez çalışmasında malign melanom hücreleri için elde ettiğimiz IC₅₀ değerine benzerlik göstermektedir.

Gerçekleştirilen bu tez projesinde detaylıca incelenen ve hücrenin doğal ölüm mekanizması olan apoptoz, antikanser tedavisi için umut verici bir hedeftir. Gerek içsel gerekse dışsal apoptoz yolağında, çok sayıda enzimin kesilerek aktifleştirilmesi ile apoptozun işleyişi kaspazlara bağlıdır. Kanser genel olarak apoptoz, proapoptotik enzimlerin inhibisyonu veya yetersiz ifadesi ve anti-apoptotik enzimlerin normalden fazla ifade olması ile engellenir. Bu değişikliklerin çoğu, en yaygın antikanser tedavisi olan kemoterapiye karşı içsel dirence neden olur. Umut verici yeni antikanser tedavileri, apoptotik yolu aktive ederek antikanser aktivite sergileyen doğal kaynaklı bileşiklerdir (Pfeffer ve Sing 2018).

Burada A-375 malign melanom hücrelerinde UA'nın etkileri apoptoz yolağında rol oynayan 84 adet genin ifade profilleri incelenmek üzere detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Bu zamana kadar UA'nın malign melanom hücrelerinde tüm apoptoz yolağı transkriptlerinin incelenerek değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır ve bu açıdan gerçekleştirilen bu tez çalışması özgün bir nitelik taşımaktadır.

Hücrede var olan doğal ölüm mekanizmalarından biri, programlı hücre ölümü olarak adlandırılan, apoptozdur ve hücrelerin sağlığı açısından da en az homeostaz kadar kritik bir prosestir. Kompleks ve bir o kadarda organize şekilde işleyen bir mekanizma olan apoptoz ile organizmada ihtiyaç fazlası veya zararlı hücrelerin bertaraf edilmesi gerçekleşmektedir. Apoptoz prosesinin aktivasyonunda hasarlı DNA veya hücrelerin kontrol dışı çoğalımı (proliferasyon) gibi çeşitli çok etken rol oynamaktadır. Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği üzere apoptoz yolağı hücre içi ve hücre dışı uyaran/sinyaller aracılığıyla aktifleştirilebilir ve bu nedenle apoptoz içsel (mitokondriyal yol) ve dışsal yol (ölüm reseptörü yolu) olarak ifade edilen iki adet yol üzerinden ilerler. Hasarlı DNA ve normal hücrelerin ihtiyaç duyduğu büyüme faktörlerinin ve sitokin eksikliği/olmaması

gibi durumlar apoptozun başlaması için gerekli hücre içi sinyallere örnektir. Sıklıkla karşılaşılan hücre dışı kaynaklı sinyaller ise sitotoksik T hücrelerinin ürettiği (hasarlı ya da enfeksiyona maruz kalmış hücrelere cevaben bağışıklık sistemi aracılığıyla) ölüm sinyalleridir. Bahsi geçen bu iki yolda cellat kaspazları olarak ifade edilen kaspazlarda birleşir. Hücre apoptoz sinyalini aldığı gibi değişiklikler başlar ve bu değişiklikler için kaspazların aktivasyonuna ihtiyaç duyulur. Hücre iskeletinin ve nükleer proteinlerin parçalanması/degradasyonu kaspaz aracılı olarak görülen apoptozun sorumlu olduğu değişikliklerdir. Diğer taraftan, kaspaz aktivite gösterdikçe apoptoza uğrayan hücrelerin küçüldüğü ve makrofaj cevabına istinaden plazma zarında değişiklikler görüldüğü bilinmektedir.

Belirtildiği üzere apoptozun işlemcileri olarak bilinen kaspazlar protein hedeflerini parçalamadan sorumlu bir sistein protein sınıfıdır. Başlatıcı kaspazlar olarak ifade edilen sınıfın kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 10 olmak üzere dört adet üyesi bulunurken, yürütücü kaspazlar ise kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 olmak üzere üç üyeden oluşur. Bu yürütücü kaspazlar hedef proteinleri hedeflemek suretiyle hücrenin sonunu getirdikleri için cellat kaspazlar olarakta ifade edilirler. Yüksek seviyede düzenlenen bir süreç olan apoptozun başlayabilmesi için sinyal şarttır. Apoptozun gecikmesi ya da inhibisyonu pek çok kanser ve otoimmün hastalık ile ilişkilendirilmektedir.

Elde edilen sonuçların yorumlanması halinde apoptoz yolağında anahtar rol oynayan 84 adet genden 66 tanesinin ifade seviyesinin kontrole kıyasla UA muamele edilen malign melanom hücrelerinde artış gösterdiği tespit edilmiştir. İfadesinde değişiklik olmayan veya düşüş gözlenen toplam gen sayısı ise 12'dir. Bu veriler ışığında UA muamelesiyle apoptoz yolağında rol oynayan genlerin çoğunlukla indüklendiği görülmektedir. Özellikle sonuçlar bölümünde sunulan Şekil 4.10'da da görüldüğü üzere apoptozun işlemcileri olarak bilinen 11 adet kaspaz çeşidinin ifade seviyeleri incelendiğinde, 8 adet kaspaz geninin ifadesinin kontrole göre artış gösterdiği, diğer 3 tanesinde gözlenen azalışın ise anlam ifade etmediği görülmüştür. Buradan yola çıkarak usnik asitin malign melanom hücrelerinde kontrole kıyasla kaspaz ifadesini arttırdığı net olarak anlaşılmaktadır. Bu sonuç daha önce Çolak vd. (2022)'nin UA'nın yumurtalık kanseri

hücre hatlarındaki etkilerini değerlendirdikleri çalışmada kaspaz genleri için aldıkları sonuç ile benzerlik göstermektedir.

Kaspaz genlerinin ifade profilleri kendi içerisinde karşılaştırıldığında ifadesinde en fazla artış gözlenen genler ifade durumuna göre (çoktan-aza) sırasıyla kaspaz 5, -4, -8, -6, -3, -10, -1 ve -9 olarak ifade edilmiştir. Kaspaz 14, kaspaz 7 ve kaspaz 2'nin ifadesi ise kontrole göre anlamlı değişiklik göstermemiştir. Buradan yola çıkarak bilinen başlatıcı kaspazlar arasındaki kaspaz 8'in ve yürütücü kaspazlardan kaspaz 3'ün diğerlerine nazaran daha yüksek ifade gösteriyor olması UA'nın apoptozun dışsal yolağını kullanıyor olduğuna işaret edebilir (Wu vd. 2016). Dışsal apoptoz yolak ile ilişkili birçok proapoptotik genin (FAS, FASLG, TNFRSF11B, TNFRSF10, TNFRSF1A, TNF, FADD, TNFRSF9, TRAF2, TRAF3, NFKB1, CD27, CD40 ve TNFRSF8) ifade seviyelerinin UA muamelesi ile kontrole göre artış göstermiş olması bu çıkarımı destekler niteliktedir (Şekil 4.7). Ayrıca kontrole göre gen ifadesinde artış gözlenen diğer bir proapoptotik enzim kaspaz 10, kaspaz 8'in homoloğu olarak bilinmektedir ve diğer bir başlatıcı kaspazdır (Wang vd. 2001). Diğer yandan TNF ailesi üyelerinden TNFRSF25, TNFRSF1B, CD40LG ve CD70 gen ifadeleri istatistiksel olarak kontrole göre değişiklik göstermemiştir. Dışsal apoptoz yolağında rol oynayan proapoptotik TNFRSF21 geni ifadesinin düşüş göstermesi ve bir anti-apoptotik gen olan CFLAR'ın da ifadesinin artış göstermesi ise bu çıkarımı çürütmek için yeterli değildir. Çünkü apoptozda proapoptotik ve anti-apoptotik genlerin arasındaki denge hücrelerin kaderini belirlemektedir (Cavalcante vd. 2019).

Enflamasyon, vücudun fiziksel ve iskemik yaralanma, enfeksiyon veya diğer travma türlerinden kaynaklı doku hasarına verdiği yanıttır. Vücudun enflamatuvar tepkisi, hasarlı dokunun onarımı ve yaralı doku bölgesinde hücrelerel çoğalma (büyüme) ile sonuçlanan hücrelerel değişikliklere ve bağışıklık tepkilerine neden olur (Bolívar vd. 2019). Enflamasyonun tümörleri hem destekleyebileceğine hem de sınırlayabileceğine dair kanıtlar vardır. Kaspaz 4 ve kaspaz 5 enflamatuvar yanıtta önemli rol oynadığı bilinen kaspaz türleridir ve gerçekleştirilen bu tez çalışmasında ifadeleri kontrole göre en fazla artış gösteren kaspazlar arasındadırlar (Şekil 4.8) (Singh vd. 2019). Bu durum ve beraberinde apoptozun artışına işaret eden diğer transkripsiyonel düzenlemeler UA

muamelesinin malign melanom hücrelerinde kaspaz 4 ve kaspaz 5 aracılığıyla da apoptoz mekanizmasını uyardığına işaret edebilir. Ayrıca çalışılan diğer anti-enflamasyon ile ilgili önemli genlerden olan IL10 genin ifade seviyesinin de UA uygulaması ile birlikte kontrole göre ciddi artış (1.8 kat) göstermesi de bu çıkarıma katkıda bulunmaktadır. Daha öncelerinde UA'nın anti-enflamasyon cevabında rol oynadığına dair elde edilmiş bulgularda bu tez çalışmasındaki sonuçları destekler niteliktedir (Geng vd. 2018).

Apoptoz inhibitörü (IAP) proteinler, hem kaspazların hem de hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir (Silke vd. 2013). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında IAP'lerden NAIP (BIRC1), BIRC2 (CIAP1), BIRC3 (CIAP2), BIRC5 (Survivin), BIRC6 (Apollon) ve XIAP'ın (BIRC4) UA muamele edilen malign melanom hücresindeki kontrole göre transkript seviyeleri incelenmiştir. Çalışılan bu genlerden sadece anti-apoptotik bir gen olan BIRC6'nın ifadesinde anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç UA'nın apoptozun negatif düzenleyicileri olan IAP proteinlerinin ifade seviyelerini bir istisna hariç arttırmadığına işaret etmektedir. Ayrıca diğer taraftan anti-apoptotik bir IAP olan BIRC5 (Survivin)'in ifadesinin kontrole göre ciddi şekilde azaldığı görülmüştür. BIRC5 genindeki bu düşüşün malign melanom hücresinde p53 geninin tespit edilen yüksek ifadesi (2.08 kat) ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Şekil 3). Çünkü daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda p53 ile Survivin proteini arasında bir ilişki olduğu, p53 proteininin Survivin proteinin baskılayarak anti-apoptotik etkisini azalttığı ifade edilmiştir (Adamkov vd. 2011, Çolak vd. 2022).

Tümör baskılayıcı gen TP53, insan kanserlerinin ~%50'sinde mutasyona uğramıştır. Tümör baskılamadaki işlevine ek olarak, p53 aynı zamanda malign ve transforme olmayan hücrelerin birçok antikanser terapötğine, özellikle DNA hasarına neden olanlara tepkisinde önemli bir rol oynar. P53, yaklaşık olarak 500 hedef geni doğrudan düzenlediği bildirilen homotetramerik bir transkripsiyon faktörü oluşturur, böylece hücre döngüsü durması, hücre yaşlanması, DNA onarımı, metabolik adaptasyon ve hücre ölümü gibi çeşitli süreçleri kontrol eder. Uzun bir süre, yeni oluşan neoplastik hücrelerde apoptotik ölümün indüklenmesi, p53'ün tümör gelişimini önlediği ana mekanizma olarak kabul edilmiştir (Adamkov vd. 2018). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında UA uygulanmış malign melanom hücresinde p53 gen ifadesinin kontrole göre ciddi artış

gösterdiği (2.08 kat) tespit edilmiştir ve bu sonuç UA'nın malign melanom hücrelerinde p53 geni ifadesini arttırdığına işaret etmektedir. P53 proteinin pozitif regülasyonundan sorumlu bir diğer ilişkili protein olan TP53BP2 kodlayan genin ifadesinin de kontrole göre arttığı görülmüştür ve bu sonuçta UA muamelesi ile birlikte malign melanom hücresinde tümörün baskılandığına işaret etmektedir (Huo vd. 2022). Ayrıca gerçekleştirilen bu tez çalışmasında p53'e yapısal benzerliği nedeniyle homoloğu olarak bilinen p73 geni de çalışılmıştır ve ifadesinde kontrole göre düşüş (2.36 kat düşüş) olduğu belirlenmiştir. Ancak p73'ün mekanizması p53 kadar net değildir ve p73'teki düşüşün p53'ü etkilemediği bilinmektedir (Rozenberg vd. 2021). p73'ün hem proapoptotik ya da antiapoptotik olabileceğine dair ciddi şüpheler bulunmaktadır ve literatürde iki ihtimale yönelikte araştırma bulguları vardır (Pozniak vd. 2000, Rozenberg vd. 2021).

Apoptozun içsel yolunda rol oynayan B-hücreli lenfoma 2 (BCL-2) protein ailesinin üyeleri, pro- ve anti-apoptotik aktivitelere sahip anahtar düzenleyicilerdir. Bu düzenleyiciler, sağlıklı hücrelerde ince ve hassas bir dengede tutulurlar. Aslında, hücrelerin geri dönüşümsüz olarak hücre ölümüne yönelmesine veya tersine hücrelerin apoptozdan kalıcı olarak kaçmasına ve kendilerini kötü huylu bir klon haline getirmesine neden olabilirler (Carnerio ve El-Deiry, 2020). Son yirmi yılda, BCL-2 ailesinin üyeleri tanımlanmış ve etki alanlarına ve işlevlerine göre sınıflandırılmıştır. Kısa korunmuş sekans bölgelerinin (BCL-2 homoloji [BH] motifleri) varlığı ile karakterize edilen BCL-2 ailesinin proteinleri, üç alt gruba ayrılır. Bu gruplar örnekleriyle birlikte BCL-2 ve BCL-XL ile temsil edilen anti-apoptotik/hayatta kalma yanlısı proteinler, BAX ve Bak ile temsil edilen pro-apoptotik proteinler ve BAD ve BID ile temsil edilen sadece pro-apoptotik BH3 proteinleridir (Luna-Vargas ve Chipuk 2016).

Genel olarak, kötü huylu tümörler esas olarak el cerrahisi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi ile tedavi edilir. Bunlardan kemoterapi, birçok yan etkisine rağmen şu anda en etkili olanlardan biridir ve küçük molekülü inhibitörler, kanser hedefli tedavi için temsili bir stratejidir (Luna-Vargas ve Chipuk 2016). Hedefe yönelik tedavinin etki mekanizması, ilaç moleküllerinin hedef proteinin bağlanma cebini veya aktif bölgesini işgal ederek protein fonksiyon kaybına neden olmasıdır (Adamkov vd. 2018). Bcl-2 proteininin tümör hücrelerinde ekspresyonu normal hücrelere göre çok

daha yüksek olduğu için onu hedef alan inhibitörlerin normal hücreler üzerinde çok az etkisi vardır. Sonuç olarak, BCL-2 anti-apoptotik proteini inhibe ederek tümör hücrelerinin apoptoza karşı direncini aşmak, tümör patogeneze dayalı yeni bir terapötik rejimdir (Adamkov vd. 2018).

Kanserdeki çoklu fonksiyonları nedeniyle, BCL-2 ailesi proteinleri, tümör hücrelerini çeşitli endojen ve ekzojen baskılar altında apoptozdan koruyabilen antikanser ilaçları için ilginç hedefler haline gelmiştir. Bu nedenle gerçekleştirilen bu tez çalışmasında A-375 malign melanom hücrelerinde UA'nın etkileri incelenirken BCL-2 ailesi üyelerini transkript seviyeleri de ele alınmıştır. Bu kapsamda anti-apoptotik BCL-2 üyelerinden BCL2, BCL2L1, BCL2A1 ve BCL2L10'un ifade seviyelerinin kontrole göre anlamlı şekilde arttığı görülmektedir. Diğer anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyelerinden MCL1'in ifadesinin anlamlı şekilde düştüğü, BCL2L2'nin ifadesinin ise kontrole göre değişmediği tespit edilmiştir. Diğer taraftan proapoptotik BCL2 üyeleri değerlendirildiğinde, BAX, BID, BAD, HRK, BNIP3 ve BCL10 genlerinin ifade seviyelerinin kontrole göre anlamlı şekilde arttığı, BNIP3L'nin ifadesinin ise düştüğü belirlenmiştir. BAK1, BCL2L11 ve BIK ifadesindeki değişikliklerin ise anlamlı olmaması nedeniyle ifadelerinin kontrol seviyesinde oldukları görülmektedir. Apoptozun içsel yolağında rol oynayan diğer genler APAF-1, Cytc (sitokrom salınımından sorumlu) ve kaspaz 9'dur ve bu çalışmada Cytc ve kaspaz 9 genlerinin ifade seviyelerinin artış gösterdiği, APAF-1'in ise düşüş gösterdiği görülmüştür. Bu genler tarafından kodlanan 3 proteinin biraraya gelmek suretiyle apoptozom kompleksini oluşturdıkları bilinmektedir. Ardından ise kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktifleştirmeleri sonucunda apoptoz süreci oluşur. Hatırlanacağı üzere kaspaz 3 ve kaspaz 6'nın gen ifadelerinin artmış olduğu daha önce belirtilmişti. Buradan yola çıkarak UA muamelesinin malign melanom hücrelerinde apoptozun iç – mitokondriyal yolağını da aktif edebildiğini gözlemlemekteyiz.

Günümüzde dek UA'nın kanser hücre hatları üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği diğer çalışmalarda UA'nın apoptozun hem içsel hemde dışsal yolağını kullandığına dair bulgular elde edilmiştir. Bačkorová vd. (2011)'nin çalışmasında UA'nın HT-29 (kolorektal adenokarsinom) ve A2780 (yumurtalık kanseri hattı) hücreleri üzerinde apoptozu indükleyici etki gösterdiği ve bu etkinin mitokondriyal yol aracılığı ile

gerçekleştirdiği ifade edilmiştir (Bačkorová vd. 2011). Daha sonra Song vd. (2012) tarafından UA'nın Bcap-37 (meme kanseri hücre hattı) hücrelerinde apoptozu mitokondriyal yol aracılığı ile indüklediği bildirilmiştir (Song vd. 2012). Benzer şekilde Geng vd. (2018) da UA'nın mide kanseri hücreleri üzerindeki apoptozu indükleyici etkisinin mitokondriyal yol aracılığı ile gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Çolak vd. (2022) ise bizim bu tez çalışmasında da tespit ettiğimize benzer şekilde UA'nın yumurtalık kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediği ve bunun dışsal yol aracılığı ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Çolak vd. 2022). Bizde bu tez çalışmasında elde ettiğimiz veriler ışığında UA'nın malign melanom hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve bunu da ağırlıklı olarak dışsal yol aracılığı ile gerçekleştirdiğini tespit etmiş bulunmaktayız. Ancak içsel yolun regülasyonunun da UA aracılı apoptoz indüksiyonuna katkı sağladığını görmekteyiz. Dolayısıyla elde ettiğimiz bulguların yukarıda bahsedilen literatürler ile uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında liken sekonder metabolitlerinden usnik asitin insan melanosit hücre hattı ve malign melanom hücre hattı kullanılmak suretiyle apoptoz yolağı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve çeşitli moleküler ve biyokimyasal yaklaşımlar ile uzun vadede kanser tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçların kümülatif olarak değerlendirilmesi halinde, literatürde diğer kanser hücre hatlarıyla gerçekleştirilmiş usnik asit çalışmalarıyla da uyumlu bir şekilde, usnik asitin malign melanom hücre hattında anti-proliferatif etki gösterdiği saptanmıştır. Apoptoz ile ilgili 84 adet genin kontrol ve uygulama grubu arasında sergiledikleri değişen ifade profilleri ve Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 enzim aktivitesi testlerinden elde edilen sonuçlar, usnik asitin insan malign melanom hücre hattında apoptozu indüklemek suretiyle anti-kanser etki sergileyebileceğini göstermiştir. Bu etkinin apoptozun hem dışsal hem de içsel yolağı üzerinden geliştiği fakat mRNA profiline göre değerlendirdiğimizde daha baskın olarak dışsal yolağın kullanıldığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen çıktıların cilt kanseri tedavisinde usnik asitin ilaç aday molekülü olarak kullanılabilmesine işaret ettiği düşünülmektedir. Elde edilen bulguların diğer araştırmacılar için de önemli bir kaynak teşkil etmesi umudunu taşımaktayız. Usnik asitin topikal veya transdermal uygulamalar şeklinde ilaç olarak kullanımının ileride cilt kanseri tedavisinde önemli potansiyel taşıyabileceğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- Abbasi, Naheed R, Helen M Shaw, Darrell S Rigel, Robert J Friedman, William H McCarthy, Iman Osman, Alfred W Kopf and David Polsky 2004. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *Jama* 292: 2771-2776.
- Abbes, Wiem, Dorra Sellami, Stella Marc-Zwecker and Cecilia Zanni-Merk 2021. Fuzzy decision ontology for melanoma diagnosis using KNN classifier. *Multimedia Tools and Applications* 80: 25517-25538.
- Abo-Khatwa, AN, AA Al-Robai and DA Al-Jawhari 1996. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. *Natural Toxins* 4: 96-102.
- Adamkov, M., E. Halasova, J. Rajcani, M. Bencat, D. Vybohova, S. Rybarova and S. Galbavy 2011. "Relation between expression pattern of p53 and survivin in cutaneous basal cell carcinomas." *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 17(3): BR74.
- Adjiri, Adouda 2017. DNA mutations may not be the cause of cancer. *Oncology and therapy* 5: 85-101.
- Ahmed, Muhammed and Long-Cheng Li 2013. Adaptation and clonal selection models of castration-resistant prostate cancer: Current perspective. *International Journal of Urology* 20: 362-371.
- Allegra, Danilo, Vera Bilan, Angela Garding, Hartmut Döhner, Stephan Stilgenbauer, Florian Kuchenbauer and Daniel Mertens 2014. Defective DROSHA processing contributes to downregulation of MiR-15/-16 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 28: 98-107.
- Alves-Silva, JM, A Romane and T Efferth 2017. North African Medicinal Plants Traditionally Used in Cancer Therapy. *Front Pharmacol* 8. In North African Medicinal Plants Traditionally Used in Cancer Therapy. *Front Pharmacol* 8.
- Alzahrani, Saeed, Waleed Al-Nuaimy and Baidaa Al-Bander 2019. Seven-point checklist with convolutional neural networks for melanoma diagnosis. In Seven-point checklist with convolutional neural networks for melanoma diagnosis, 2019 8th European Workshop on Visual Information Processing (EUVIP), 211-216: IEEE.
- Amirchaghmaghi, Maryam, Farnaz Falaki, Nooshin Mohtasham and Pegah Mosannen Mozafari 2008. Extralingival pyogenic granuloma: a case report. *Cases journal* 1: 1-3.
- Anonim. 2022. Web Sites: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/skin-cancer/symptoms-causes/syc-20377605> Erişim Tarihi : 19.12.2022.

- Antal, Corina E, Andrew M Hudson, Emily Kang, Ciro Zanca, Christopher Wirth, Natalie L Stephenson, Eleanor W Trotter, Lisa L Gallegos, Crispin J Miller and Frank B Furnari 2015. Cancer-associated protein kinase C mutations reveal kinase's role as tumor suppressor. *Cell* 160: 489-502.
- Antonenko, Yuri N, Ljudmila S Khailova, Tatyana I Rokitskaya, Ekaterina S Nosikova, Pavel A Nazarov, A Luzina Ol'ga, Nariman F Salakhutdinov and Elena A Kotova 2019. Mechanism of action of an old antibiotic revisited: Role of calcium ions in protonophoric activity of usnic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1860: 310-316.
- Ashhab, Yaqoub, Akram Alian, Aaron Polliack, Amos Panet and Dina Ben Yehuda 2001. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *Febs Letters* 495: 56-60.
- Avery-Kiejda, Kelly A, Nikola A Bowden, Amanda J Croft, Lyndee L Scurr, Carla F Kairupan, Katie A Ashton, Bente A Talseth-Palmer, Helen Rizos, Xu D Zhang and Rodney J Scott 2011. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC cancer* 11: 1-17.
- Baatar, D, S Kitano, T Yoshida, T Bando, K Ninomiya and T Matsumoto IS (A)-4 THE INCIDENCE AND DISSECTION EFFECTS.
- Báčková, M, M Bačkor, J Mikeš, R Jendželovský and P Fedoročko 2011. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicology in vitro* 25: 37-44.
- Bai, Ling and Wei-Guo Zhu 2006. p53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol* 2: 141-153.
- Bakke, Antony C 2001. The principles of flow cytometry. *Laboratory medicine* 32: 207-211.
- Bánhegyi, Gábor, Eva Margittai, András Szarka, József Mandl and Miklós Csala 2012. Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum. *Antioxidants & redox signaling* 16: 772-780.
- Bernardini, S., A. Tiezzi, V. Laghezza Masci and E. Ovidi 2017. "Natural products for human health."
- Bessadottir, Margret, Mar Egilsson, Eydis Einarsdottir, Iris H Magnusdottir, Margret H Ogmundsdottir, Sesselja Omarsdottir and Helga M Ogmundsdottir 2012. Proton-shuttling lichen compound usnic acid affects mitochondrial and lysosomal function in cancer cells. *PloS one* 7: e51296.
- Bi, Sheng and Lin Li 2013. Browning of white adipose tissue: role of hypothalamic signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1302: 30-34.

- Bjerke, Jarle W, Arve Elvebakk, Erwin Domínguez and Arne Dahlback 2005. Seasonal trends in usnic acid concentrations of Arctic, alpine and Patagonian populations of the lichen *Flavocetraria nivalis*. *Phytochemistry* 66: 337-344.
- Black, Paul H 1980. Shedding from the cell surface of normal and cancer cells. *Advances in Cancer Research* 32: 75-199.
- Bolívar, B. E., T. P. Vogel and L. Bouchier-Hayes 2019. "Inflammatory caspase regulation: maintaining balance between inflammation and cell death in health and disease." *The FEBS journal* 286(14): 2628-2644.
- Boniol, Mathieu, Philippe Autier, Peter Boyle and Sara Gandini 2012. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 345.
- Cardile, V., A. Graziano, R. Avola, M. Piovano and A. Russo 2017. "Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid." *Chemico-biological interactions* 263: 36-45.
- Carneiro, B. A. and W. S. El-Deiry 2020. "Targeting apoptosis in cancer therapy." *Nature reviews Clinical oncology* 17(7): 395-417.
- Cavalcante, G. C., A. P. Schaan, G. F. Cabral, M. N. Santana-da-Silva, P. Pinto, A. F. Vidal and Â. Ribeiro-dos-Santos 2019. "A cell's fate: an overview of the molecular biology and genetics of apoptosis." *International journal of molecular sciences* 20(17): 4133.
- Cancer, International Agency for Research on 1992. Solar and ultraviolet radiation. In *Solar and ultraviolet radiation*, 316-316.
- Cell, Danial NN Korsmeyer SJ 2004. 116: 205–219. doi: 10.1016. S0092-8674 (04): 00046-00047.
- Chang, Hao 2017. Skin cancer reorganization and classification with deep neural network. *arXiv preprint arXiv:1703.00534*.
- Chen, Yanyang, Hang Yin, Yong Tao, Shenxi Zhong, Haoyang Yu, Jianxiao Li, Zhibiao Bai and Yunsheng Ou 2020. Antitumor effects and mechanisms of pyropheophorbide- α methyl ester-mediated photodynamic therapy on the human osteosarcoma cell line MG-63. *International journal of molecular medicine* 45: 971-982.
- Chen, Yunching, Dong-Yu Gao and Leaf Huang 2015. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Advanced drug delivery reviews* 81: 128-141.
- Cheng, J. J.-J. Y.-C. and K. C.-H. Shuen-KueiLiao 2001. Enhanced Cytolytic Activity of T Lymphocytes by Melanoma Apoptotic Body-Pulsed Dendritic Cells. *Abstracts of Asian-Pacific Conference of Tumor Biology* 2001.

- Cimmino, Amelia, George Adrian Calin, Muller Fabbri, Marilena V Iorio, Manuela Ferracin, Masayoshi Shimizu, Sylwia E Wojcik, Rami I Aqeilan, Simona Zupo and Mariella Dono 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 13944-13949.
- Clarke, Robert, Jim Halsey, Sarah Lewington, Eva Lonn, Jane Armitage, JoAnn E Manson, Kaare H Bønaa, J David Spence, Ottar Nygård and Rex Jamison 2010. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Archives of internal medicine* 170: 1622-1631.
- Cohen, Lisa M 1995. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 33: 923-936.
- Collins, Kathleen, Tyler Jacks and Nikola P Pavletich 1997. The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 2776-2778.
- Coussens, Lisa M and Zena Werb 1996. Matrix metal loproteinases and the development of cancer. *Chemistry & biology* 3: 895-904.
- Cragg, G. M. and D. J. Newman 2013. "Natural products: a continuing source of novel drug leads." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830(6): 3670-3695.
- Croce, Carlo M 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics* 10: 704-714.
- Çolak, B., D. Cansaran-Duman, G. Guney Eskiler, K. Földes and S. Yangın 2022. "Usnic acid-induced programmed cell death in ovarian cancer cells." *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali* 33(1): 143-152.
- D'Arcy, Mark S 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international* 43: 582-592.
- De Duve, Christian, BC Pressman, R Gianetto, R Wattiaux and Françoise Appelmanns 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal* 60: 604.
- Demierre, Marie-France and Larry Nathanson 2003. Chemoprevention of melanoma: an unexplored strategy. *Journal of Clinical Oncology* 21: 158-165.
- DePinho, Ronald A 2000. The age of cancer. *Nature* 408: 248-254.
- Deshpande, Amit, Peter Sicinski and Philip W Hinds 2005. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24: 2909-2915.
- Dewson, Grant and Ruth M Kluck 2010. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton* 2: 9-22.

- Diepgen, Thomas L and V Mahler 2002. The epidemiology of skin cancer. *British Journal of Dermatology* 146: 1-6.
- Diffey, BL and JAA Langtry 2005. Skin cancer incidence and the ageing population. *British Journal of Dermatology* 153: 679-680.
- dos Santos Silva, Isabel, Craig D Higgins, Tanya Abramsky, Maureen A Swanwick, Jacqueline Frazer, Linda M Whitaker, Margaret E Blanshard, John Bradshaw, John M Apps and D Timothy Bishop 2009. Overseas sun exposure, nevus counts, and premature skin aging in young English women: a population-based survey. *Journal of investigative dermatology* 129: 50-59.
- El Ghissassi, Fatiha, Robert Baan, Kurt Straif, Yann Grosse, Béatrice Secretan, Véronique Bouvard, Lamia Benbrahim-Tallaa, Neela Guha, Crystal Freeman and Laurent Galichet 2009. A review of human carcinogens—part D: radiation. *The lancet oncology* 10: 751-752.
- Eryilmaz, Isil Ezgi, Gamze Guney Eskiler, Unal Egeli, Beste Yurdacan, Gulsah Cecener and Berrin Tunca 2018. In vitro cytotoxic and antiproliferative effects of usnic acid on hormone-dependent breast and prostate cancer cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 32: e22208.
- Esteva, Andre, Brett Kuprel, Roberto A Novoa, Justin Ko, Susan M Swetter, Helen M Blau and Sebastian Thrun 2017. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature* 542: 115-118.
- Fais, Stefano and Michael Overholtzer 2018. Cell-in-cell phenomena in cancer. *Nature reviews cancer* 18: 758-766.
- Fanale, Daniele, Juan Lucio Iovanna, Antonio Giordano, Christian Rolfo and Antonio Russo 2017. Cancer Clonal Evolution and Intra-tumor Heterogeneity. In *Liquid Biopsy in Cancer Patients*, 27-39: Springer.
- Farrell, Paul J 2019. Epstein–Barr virus and cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 14: 29-53.
- Ferlay, Jacques, Murielle Colombet, Isabelle Soerjomataram, Donald M Parkin, Marion Piñeros, Ariana Znaor and Freddie Bray 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer* 149: 778-789.
- Fernandez-Flores, Angel and Isabel Colmenero 2018. Campbell de Morgan spots (cherry Angiomas) show endothelial proliferation. *The American Journal of Dermatopathology* 40: 894-898.
- Fernández, Álvaro F, Salwa Sebt, Yongjie Wei, Zhongju Zou, Mingjun Shi, Kathryn L McMillan, Congcong He, Tabitha Ting, Yang Liu and Wei-Chung Chiang 2018. Disruption of the beclin 1–BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature* 558: 136-140.

- Festjens, Nele, Tom Vanden Berghe and Peter Vandenabeele 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1757: 1371-1387.
- Fink, Susan L and Brad T Cookson 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity* 73: 1907-1916.
- Florey, Oliver, Sung Eun Kim, Cynthia P Sandoval, Cole M Haynes and Michael Overholtzer 2011. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nature cell biology* 13: 1335-1343.
- Folkman, Judah 2003. Angiogenesis and apoptosis. In *Angiogenesis and apoptosis, Seminars in cancer biology*, 159-167: Elsevier.
- Fong, PY, WC Xue, HYS Ngan, PM Chiu, KYK Chan, SW Tsao and ANY Cheung 2006. Caspase activity is downregulated in choriocarcinoma: a cDNA array differential expression study. *Journal of clinical pathology* 59: 179-183.
- Fulda, Simone 2010. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International journal of cell biology* 2010.
- Fulda, Simone 2009. Tumor resistance to apoptosis. *International journal of cancer* 124: 511-515.
- Fulda, Simone, Marek Los, Claudia Friesen and Klaus-Michael Debatin 1998. Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *International journal of cancer* 76: 105-114.
- Galanty, Agnieszka, Paweł Paśko and Irma Podolak 2019. Enantioselective activity of usnic acid: A comprehensive review and future perspectives. *Phytochemistry Reviews* 18: 527-548.
- Galluzzi, Lorenzo, Eugenia Morselli, Oliver Kepp, Ilio Vitale, Alice Rigoni, Erika Vacchelli, Mickael Michaud, Hans Zischka, Maria Castedo and Guido Kroemer 2010. Mitochondrial gateways to cancer. *Molecular aspects of medicine* 31: 1-20.
- Garofalo, M, GL Condorelli, CM Croce and G Condorelli 2010. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell Death & Differentiation* 17: 200-208.
- Gavin, A and AE Evans 1988. The Northern Ireland Cancer Registry. *The Ulster Medical Journal* 57: 129.
- Geiger, Thomas R and Daniel S Peeper 2009. Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1796: 293-308.

- Geng, Xiaoge, Xing Zhang, Bin Zhou, Chenjing Zhang, Jiangfeng Tu, Xiaojun Chen, Jingya Wang, Huiqin Gao, Guangming Qin and Wensheng Pan 2018. Usnic acid induces cycle arrest, apoptosis, and autophagy in gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 24: 556.
- Gerlee, Philip, Philipp M Altrock, Adam Malik, Cecilia Krona and Sven Nelander 2022. Autocrine signaling can explain the emergence of Allee effects in cancer cell populations. *PLoS computational biology* 18: e1009844.
- Ghobrial, Irene M, Thomas E Witzig and Alex A Adjei 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians* 55: 178-194.
- Glass, Andrew G and Robert N Hoover 1989. The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer. *Jama* 262: 2097-2100.
- Glücksman, A and FG Spear 1939. The effect of gamma radiation on cells in vivo part II. *The British Journal of Radiology* 12: 486-498.
- Goldsmith, Lowell A, Frederic B Askin, Alfred E Chang, Cynthia Cohen, Janice P Dutcher, Robert S Gilgor, Stephanie Green, Emily L Harris, Stephen Havas and June K Robinson 1992. Diagnosis and treatment of early melanoma: NIH consensus development panel on early melanoma. *Jama* 268: 1314-1319.
- Goodwin, RG, SA Holme and DL Roberts 2004. Variations in registration of skin cancer in the United Kingdom. *Clinical and Experimental Dermatology: Viewpoints in dermatology* 29: 328-330.
- Gray, LH 1952. Actions of radiations on living cells, 1946 and after the second Douglas Lea memorial lecture. *The British Journal of Radiology* 25: 235-244.
- Green, Douglas R and Gerard I Evan 2002. A matter of life and death. *Cancer cell* 1: 19-30.
- Grob, JJ and JJ Bonerandi 1998. The 'ugly duckling' sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. *Archives of dermatology* 134: 103-104.
- Gross, A 1999. McDonnell JM, and Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-1911.
- Guicciardi, Maria Eugenia and Gregory J Gores 2009. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal* 23: 1625-1637.
- Guo, Lei, Qiang Shi, Jia-Long Fang, Nan Mei, A Afshan Ali, Sherry M Lewis, Julian EA Leakey and Vasilios H Frankos 2008. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 26: 317-338.
- Guzow-Krzemińska, Beata, Emmanuël Sérusiaux, Pieter PG van den Boom, A Maarten Brand, Annina Launis, Anna Łubek and Martin Kukwa 2019. Understanding the evolution of phenotypical characters in the *Micarea prasina* group

- (Pilocarpaceae) and descriptions of six new species within the group. *MycoKeys* 57: 1.
- Hafner, Christian and Thomas Vogt 2008. Seborrheic keratosis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 6: 664-677.
- Hakomori, Senitiroh 2002. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10231-10233.
- Hartwell, J. L. 1971. "Plants used against cancer. A survey." *Lloydia* 34(1): 103-160.
- Hatzikirou, Haralampos, David Basanta, Matthias Simon, K Schaller and Andreas Deutsch 2012. 'Go or grow': the key to the emergence of invasion in tumour progression? *Mathematical medicine and biology: a journal of the IMA* 29: 49-65.
- Heidari, Alireza 2019. Three-Dimensional (3D) Imaging Spectroscopy of Carcinoma, Sarcoma, Leukemia, Lymphoma, Multiple Myeloma, Melanoma, Brain and Spinal Cord Tumors, Germ Cell Tumors, Neuroendocrine Tumors and Carcinoid Tumors under Synchrotron Radiation, *Res Adv Biomed Sci Technol. synchrotron radiation* 1: 218.
- Hengartner, Michael O 2001. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* 104: 325-328.
- Hoey, SEH, CEJ Devereux, L Murray, D Catney, A Gavin, S Kumar, D Donnelly and OM Dolan 2007. Skin cancer trends in Northern Ireland and consequences for provision of dermatology services. *British Journal of Dermatology* 156: 1301-1307.
- Hong, Ji-Young, Hwa-Jin Chung, Hye-Jung Lee, Hyen Joo Park and Sang Kook Lee 2011. Growth inhibition of human lung cancer cells via down-regulation of epidermal growth factor receptor signaling by yuanhuadine, a daphnane diterpene from *Daphne genkwa*. *Journal of natural products* 74: 2102-2108.
- Høyer-Hansen, M and MJCD Jäättelä 2007. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death & Differentiation* 14: 1576-1582.
- Hu, Jiangfeng, Bensong Duan, Weiliang Jiang, Sengwang Fu, Hengjun Gao and Lungen Lu 2019. Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP 1) suppressed the growth of hepatocellular carcinoma cells by promoting Semaphorin 3B (SEMA 3B). *Cancer Medicine* 8: 3152-3166.
- Hu, Qi, Di Wu, Wen Chen, Zhen Yan and Yigong Shi 2013. Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *Journal of Biological Chemistry* 288: 15142-15147.
- Huang, Xiao Xuan, Françoise Bernerd and Gary Mark Halliday 2009. Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin. *The American journal of pathology* 174: 1534-1543.

- Huang, A. C. and R. Zappasodi (2022). "A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance." *Nature immunology* 23(5): 660-670.
- Hung, Esther Hiu Yee, James Francis Griffith, Alex Wing Hung Ng, Ryan Ka Lok Lee, Domily Ting Yi Lau and Jason Chi Shun Leung 2014. Ultrasound of musculoskeletal soft-tissue tumors superficial to the investing fascia. *American Journal of Roentgenology* 202: W532-W540.
- Huo, Y., K. Cao, B. Kou, M. Chai, S. Dou, D. Chen, Y. Shi and X. Liu 2022. "Tumor Suppressor p53-Binding Protein 2 (TP53BP2): Roles in suppressing tumorigenesis and therapeutic opportunities." *Genes & Diseases*.
- Ichimiya, Tadashi, Tsukasa Yamakawa, Takehiro Hirano, Yoshihiro Yokoyama, Yuki Hayashi, Daisuke Hirayama, Kohei Wagatsuma, Takao Itoi and Hiroshi Nakase 2020. Autophagy and autophagy-related diseases: a review. *International journal of molecular sciences* 21: 8974.
- Ingelfinger, Rebecca, Marina Henke, Luise Roser, Thomas Ulshöfer, Anjuli Calchera, Garima Singh, Michael J Parnham, Gerd Geisslinger, Robert Fürst and Imke Schmitt 2020. Unraveling the pharmacological potential of lichen extracts in the context of cancer and inflammation with a broad screening approach. *Frontiers in pharmacology* 11: 1322.
- Ingolfssdottir, K 2002. Usnic acid. *Phytochemistry* 61: 729-736.
- Jacobs, IJ, MF Kohler, RW Wiseman, JR Marks, R Whitaker, BAJ Kerns, P Humphrey, A Berchuck, BAJ Ponder and RC Bast Jr 1992. Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation, and X-chromosome inactivation. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 84: 1793-1798.
- Jafarzadeh, Hamid, Majid Sanatkhan and Nooshin Mohtasham 2006. Oral pyogenic granuloma: a review. *Journal of oral science* 48: 167-175.
- Jänicke, Reiner U 2009. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast cancer research and treatment* 117: 219-221.
- Jiang, Ningni, Qijie Dai, Xiaorui Su, Jianjiang Fu, Xuancheng Feng and Juan Peng 2020. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Molecular biology reports* 47: 4587-4629.
- Jovanovic, Lidija, Brett Delahunt, Bryan McIver, Norman L Eberhardt and Stefan KG Grebe 2003. Thyroid gland clonality revisited: the embryonal patch size of the normal human thyroid gland is very large, suggesting X-chromosome inactivation tumor clonality studies of thyroid tumors have to be interpreted with caution. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88: 3284-3291.
- Kang, Min H and C Patrick Reynolds 2009. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research* 15: 1126-1132.

- Katalinic, Alexander, U Kunze and T Schäfer 2003. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *British Journal of Dermatology* 149: 1200-1206.
- Kerr, A 1972. Biological control of crown gall: seed inoculation. *Journal of Applied Bacteriology* 35: 493-497.
- Kerr, JFR and AH Wyllie Currie Ar (1972) A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239.
- Kessel, David 2020. Photodynamic therapy: apoptosis, paraptosis and beyond. *Apoptosis* 25: 611-615.
- Key, Timothy JA 1995. Hormones and cancer in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 333: 59-67.
- Khalid, E. B., E. Ayman, H. Rahman, G. Abdelkarim and A. Najda 2016. "Natural products against cancer angiogenesis." *Tumor Biology* 37(11): 14513-14536.
- Khalili, Maryam and James A Radosevich 2018. Paraptosis. *Apoptosis and Beyond: The Many Ways Cells Die*: 343-366.
- Khavari, Paul A 2006. Modelling cancer in human skin tissue. *Nature Reviews Cancer* 6: 270-280.
- Kieser, Arnd, Herbert A Weich, Gerhard Brandner, Dieter Marmé and Walter Kolch 1994. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9: 963-970.
- Kim, Caroline C, Susan M Swetter, Clara Curiel-Lewandrowski, James M Grichnik, Douglas Grossman, Allan C Halpern, John M Kirkwood, Sancy A Leachman, Ashfaq A Marghoob and Michael E Ming 2015. Addressing the knowledge gap in clinical recommendations for management and complete excision of clinically atypical nevi/dysplastic nevi: Pigmented Lesion Subcommittee consensus statement. *JAMA dermatology* 151: 212-218.
- Millot, M., Kaouadji, M., Champavier, Y., Gamond, A., Simon, A., Chulia, A. J. 2013. Usnic acid derivatives from *Leprocaulon microscopicum*. *Phytochemistry Letters*, 6(1), 31-35.
- Kim, Hayeon, Chung-Yeul Kim, Kyong Hwa Park and Aeree Kim 2018. Clonality analysis of multifocal ipsilateral breast carcinomas using X-chromosome inactivation patterns. *Human pathology* 78: 106-114.
- Kim, Jae-Hong, Hwa-young Park and Sung Ku Ahn 2009. Cherry angiomas on the scalp. *Case Reports in Dermatology* 1: 82-86.
- Kim, William Y and William G Kaelin 2004. Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of clinical oncology* 22: 4991-5004.

- Klaus, Alexandra and Walter Birchmeier 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer* 8: 387-398.
- Kotoku, N., M. Arai and M. Kobayashi 2016. "Search for anti-angiogenic substances from natural sources." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 64(2): 128-134.
- Kransdorf, Mark J and Mark D Murphey 2006. *Imaging of soft tissue tumors: Lippincott williams & wilkins.*
- Kresno, Siti Boedina and Soehartati Gondhowiardjo 2004. Disregulation process of cancer cell proliferation. *Acta Med Indones* 36: 169-176.
- Kroemer, G 2007. Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99-163.
- Kroemer, G, WS El-Deiry, Pl Golstein, ME Peter, D Vaux, Peter Vandenabeele, B Zhivotovsky, MV Blagosklonny, W Malorni and RA Knight 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation* 12: 1463-1467.
- Krüger, Marcus and Peter Richter 2022. To Die or Not to Die: Cell Death in Biology and Disease. In *To Die or Not to Die: Cell Death in Biology and Disease*, 6734: MDPI.
- Kumar K, Mishra JP, Singh RP 2020. Usnic acid induces apoptosis in human gastric cancer cells through ROS generation and DNA damage and causes up-regulation of DNA-PKcs and γ -H2A. X Phosphorylation. *Chem Biol Interact* 315:108898
- Kvaskoff, Marina, Nirmala Pandeya, Adèle C Green, Susan Perry, Catherine Baxter, Marcia B Davis, Rohan Mortimore, Lorraine Westacott, Dominic Wood and Joe Triscott 2013. Site-Specific Determinants of Cutaneous Melanoma: A Case–Case Comparison of Patients with Tumors Arising on the Head or Trunk Site-Specific Determinants of Cutaneous Melanoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 22: 2222-2231.
- Kwong, S. P., Z. Huang, L. Ji and C. Wang 2021. "PORIMIN: The key to (+)-Usnic acid-induced liver toxicity and oncotic cell death in normal human L02 liver cells." *Journal of Ethnopharmacology* 270: 113873.
- LaCasse, EC, DJ Mahoney, HH Cheung, S Plenchette, S Baird and RG Korneluk 2008. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27: 6252-6275.
- Lallas, Konstantinos, Panagiotis Anagnostis, Patroklos Theocharis, Eirini Boureka, Athanasios Kyrgidis, Eleftherios Klonos, Georgios Papazisis, Zoe Apalla, Aimilios Lallas and Efstratios Vakirlis 2022. The effect of menopausal hormone therapy on the risk of melanoma and keratinocyte skin cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Maturitas*.
- Lane, David P 1992. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.

- Lau, R and MAC Pratt 2012. The opposing roles of cellular inhibitor of apoptosis proteins in cancer. *International Scholarly Research Notices* 2012.
- Lavrik, I 2005. Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118: 265-267.
- Leiter, U., T. Eigentler and C. Garbe 2014. "Epidemiology of skin cancer." *Sunlight, vitamin D and skin cancer*: 120-140.
- Lepucki, Arkadiusz, Kinga Orlińska, Aleksandra Mielczarek-Palacz, Jacek Kabut, Pawel Olczyk and Katarzyna Komosińska-Vassev 2022. The Role of Extracellular Matrix Proteins in Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine* 11: 1250.
- Levine, AJ 1991. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453-456.
- Li, Linheng and William B Neaves 2006. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Research* 66: 4553-4557.
- Liehr, Joachim G and J Jones 2001. Role of iron in estrogen-induced cancer. *Current medicinal chemistry* 8: 839-849.
- Liu-Smith, Feng, Jinjing Jia and Yan Zheng 2017. UV-induced molecular signaling differences in melanoma and non-melanoma skin cancer. *Ultraviolet light in human health, diseases and environment*: 27-40.
- Liu, Emma Y, Naihan Xu, Jim O'Prey, Laurence Y Lao, Sanket Joshi, Jaclyn S Long, Margaret O'Prey, Daniel R Croft, Florian Beaumatin and Alice D Baudot 2015. Loss of autophagy causes a synthetic lethal deficiency in DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 773-778.
- Lober, CW 1992. Dysplastic (atypical) nevi: significance and management. *Southern medical journal* 85: 870-877.
- Lockshin, Richard A and Carroll M Williams 1964. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *Journal of Insect Physiology* 10: 643-649.
- Lockshin, Richard A and Zahra Zakeri 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 545-550.
- Lopes, Rita Bayer, Rathi Gangeswaran, Iain A McNeish, Yaohe Wang and Nick R Lemoine 2007. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *International journal of cancer* 120: 2344-2352.
- Lopez-Bergami, P., B. Fitchman and Z. e. Ronai (2008). "Understanding signaling cascades in melanoma." *Photochemistry and photobiology* 84(2): 289-306.
- Lowe, Scott W and Athena W Lin 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495.

- Luo, Biquan and Amy S Lee 2013. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene* 32: 805-818.
- Luna-Vargas, M. P. and J. E. Chipuk 2016. "The deadly landscape of pro-apoptotic BCL-2 proteins in the outer mitochondrial membrane." *The FEBS journal* 283(14): 2676-2689.
- Luzina, OA and NF Salakhutdinov 2016. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 1. Activity against unicellular organisms. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 42: 115-132.
- Mackay, Hannah L and Patricia AJ Muller 2019. Biological relevance of cell-in-cell in cancers. *Biochemical Society Transactions* 47: 725-732.
- Madan, Vishal, John T Lear and Rolf-Markus Szeimies 2010. Non-melanoma skin cancer. *The lancet* 375: 673-685.
- Madhunapantula, S. V. and G. P. Robertson (2009). "The PTEN–AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma." *Pigment cell & melanoma research* 22(4): 400-419.
- Magalhaes, Lorena Felix, Francielli Mello-Andrade, Wanessa Carvalho Pires, Hugo Delleon Silva, Paula Francinete Faustino da Silva, Larissa Matuda Macedo, Carlos Henrique de Castro, Cristiene Costa Carneiro, Clever Gomes Cardoso and Paulo Roberto de Melo Reis 2017. cis-[RuCl (BzCN)(bipy)(dppe)] PF6 induces anti-angiogenesis and apoptosis by a mechanism of caspase-dependent involving DNA damage, PARP activation, and Tp53 induction in Ehrlich tumor cells. *Chemico-Biological Interactions* 278: 101-113.
- Maiuri, Galluzzi L 2007. Vitale I. Zischka H. Castedo M. Zitvogel L. Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14: 1237-1243.
- Majno, Guido and Isabelle Joris 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 146: 3.
- Maloney, Mary E, Daniel B Jones and F Mack Sexton 1992. Pigmented basal cell carcinoma: investigation of 70 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 27: 74-78.
- Marks, Robin 1995. The epidemiology of non-melanoma skin cancer: who, why and what can we do about it. *The Journal of dermatology* 22: 853-857.
- Marcano V 1991. Propiedades Biome' dicas de las Embriofitas Asi- fonogamas Andinas. Parte II. Liqueenes. *Revista De La Facultad De Farmacia (Merida)* 28:1–13
- Masuda, H, C Miller, HP Koeffler, H Battifora and MJ Cline 1987. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 7716-7719.

- McCarthy, Nicola J and Gerard I Evan 1997. 15 Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Current topics in developmental biology* 36: 259-278.
- McCourt, Collette, Olivia Dolan and Gerry Gormley 2014. Malignant melanoma: a pictorial review. *The Ulster Medical Journal* 83: 103.
- McGovern, VJ 1975. Spontaneous regression of melanoma. *Pathology* 7: 91-99.
- McKenna, Jeffrey K, Scott R Florell, Glenn D Goldman and Glen M Bowen 2006. Lentigo maligna/lentigo maligna melanoma: current state of diagnosis and treatment. *Dermatologic surgery* 32: 493-504.
- Meléndez, Alicia, Zsolt Tallóczy, Matthew Seaman, Eeva-Liisa Eskelinen, David H Hall and Beth Levine 2003. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301: 1387-1391.
- Mijaljica, Dalibor, Mark Prescott and Rodney J Devenish 2011. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7: 673-682.
- Millot, Marion, Mourad Kaouadji, Yves Champavier, Aurélie Gamond, Alain Simon and Albert J Chulia 2013. Usnic acid derivatives from *Leprocaulon microscopicum*. *Phytochemistry Letters* 6: 31-35.
- Mishra, B. B. and V. K. Tiwari 2011. "Natural products: an evolving role in future drug discovery." *European journal of medicinal chemistry* 46(10): 4769-4807.
- Minn, AJ, P Velez, SL Schendel, H Liang and SW Muchmore Fesik., SW, Fill, M. & Thompson, CB (1997). *Nature* (London) 385: 353-357.
- Mizushima, Noboru, Yoshinori Ohsumi and Tamotsu Yoshimori 2002. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function* 27: 421-429.
- Mlynarczuk-Bialy, Izabela, Ireneusz Dziuba, Agnieszka Sarnecka, Emilia Platos, Magdalena Kowalczyk, Katarzyna K Pels, Grzegorz M Wilczynski, Cezary Wojcik and Lukasz P Bialy 2020. Entosis: From cell biology to clinical cancer pathology. *Cancers* 12: 2481.
- Morris Kupchan, S and Herbert L Kopperman 1975. L-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia* 31: 625-625.
- Neelsen, Kai J, Isabella MY Zanini, Raquel Herrador and Massimo Lopes 2013. Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *Journal of Cell Biology* 200: 699-708.
- Newman, D. J. and G. M. Cragg 2020. "Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019." *Journal of natural products* 83(3): 770-803.
- Newton, Alexandra C 2018. Protein kinase C as a tumor suppressor. In *Protein kinase C as a tumor suppressor*, Seminars in cancer biology, 18-26: Elsevier.

- Newton, Alexandra C and John Brognard 2017. Reversing the paradigm: protein kinase C as a tumor suppressor. *Trends in pharmacological sciences* 38: 438-447.
- Nguyen, T. T. H., M. H. Dinh, H. T. Chi, S.-L. Wang, Q. Nguyen, T. D. Tran and A. D. Nguyen 2019. "Antioxidant and cytotoxic activity of lichens collected from Bidoup Nui Ba National Park, Vietnam." *Research on Chemical Intermediates* 45(1): 33-49.
- Noori, Shokoofe and Zuhair M Hassan 2012. Tehranolide inhibits proliferation of MCF-7 human breast cancer cells by inducing G0/G1 arrest and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 52: 1987-1999.
- Novelli, Marco, Antonio Cossu, Dahmane Oukrif, Alberto Quaglia, Sunil Lakhani, Richard Poulson, Peter Sasieni, Piera Carta, Marcella Contini and Anna Pasca 2003. X-inactivation patch size in human female tissue confounds the assessment of tumor clonality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 3311-3314.
- O'Brien, Mauria A and Rebecca Kirby 2008. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of veterinary emergency and critical care* 18: 572-585.
- Okuyama, Emi, Kazuhiro Umeyama, Mikio Yamazaki, Yasuhiro Kinoshita and Yoshikazu Yamamoto 1995. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta medica* 61: 113-115.
- Oren, Moshe and Varda Rotter 1999. Introduction: p53—the first twenty years. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 55: 9-11.
- Overholtzer, Michael, Arnaud A Mailleux, Ghassan Mouneimne, Guillaume Normand, Stuart J Schnitt, Randall W King, Edmund S Cibas and Joan S Brugge 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 131: 966-979.
- Ozel, Irem, Inga Duerig, Maksim Domnich, Stephan Lang, Ekaterina Pylaeva and Jadwiga Jablonska 2022. The Good, the Bad, and the Ugly: Neutrophils, Angiogenesis, and Cancer. *Cancers* 14: 536.
- Papetti, Michael and Ira M Herman 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 282: C947-C970.
- Parkin, DM, D Mesher and P Sasieni 2011. 13. Cancers attributable to solar (ultraviolet) radiation exposure in the UK in 2010. *British Journal of Cancer* 105: S66-S69.
- Penta, John S, FM Johnson, Joseph T Wachsmann and William C Copeland 2001. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 488: 119-133.
- Peter, Marcus E 2011. Apoptosis meets necrosis. *Nature* 471: 310-312.

- Phelan, John T and Josef T Prchal 2002. Clonality studies in cancer based on X chromosome inactivation phenomenon. In *Molecular Analysis of Cancer*, 251-270: Springer.
- Plati, Jessica, Octavian Bucur and Roya Khosravi-Far 2011. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative biology* 3: 279-296.
- Pozniak, C. D., S. Radinovic, A. Yang, F. McKeon, D. R. Kaplan and F. D. Miller 2000. "An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death." *Science* 289(5477): 304-306.
- Rao, Uma NM, Sandra J Lee, Weixiu Luo, Martin C Mihm Jr and John M Kirkwood 2010. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes and a dominant nodule within primary melanoma are prognostic factors for relapse-free survival of patients with thick (t4) primary melanoma: pathologic analysis of the e1690 and e1694 intergroup trials. *American journal of clinical pathology* 133: 646-653.
- Robbins, SL and V Kumar Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 2010, Philadelphia, PA: Saunders. In Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 2010, Philadelphia, PA: Saunders: Elsevier. xiv.
- Roy, Nand K, Devivasha Bordoloi, Javadi Monisha, Anand Anip, Ganesan Padmavathi and Ajaikumar B Kunnumakkara 2017. Cancer—An overview and molecular alterations in cancer. *Fusion genes and Cancer*: 1-15.
- Rozenberg, J. M., S. Zvereva, A. Dalina, I. Blatov, I. Zubarev, D. Luppov, A. Bessmertnyi, A. Romanishin, L. Alsoulaiman and V. Kumeiko 2021. "The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response." *Biology direct* 16(1): 1-21.
- Rubin, Adam I, Elbert H Chen and Désirée Ratner 2005. Basal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine* 353: 2262-2269.
- Ruffolo, P Richard 1964. The Pathogenesis of Necrosis: I. Correlated Light and Electron Microscopic Observations of the Myocardial Necrosis Induced by the Intravenous Injection of Papain. *The American journal of pathology* 45: 741.
- Russell, Paul and Paul Nurse 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45: 145-153.
- Sahu, Saura C, Margaret Amankwa-Sakyi, Michael W O'Donnell Jr and Robert L Sprando 2012. Effects of usnic acid exposure on human hepatoblastoma HepG2 cells in culture. *Journal of Applied Toxicology* 32: 722-730.
- Samavat, Hamed and Mindy S Kurzner 2015. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer letters* 356: 231-243.
- Saraste, Antti and Kari Pulkki 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research* 45: 528-537.

- Sasaki, Kanae and Hiderou Yoshida 2015. Organelle autoregulation—stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. *The journal of biochemistry* 157: 185-195.
- Schneider, Pascal and Jürg Tschopp 2000. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmacochimistry library* 31: 281-286.
- Schröder, M 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cellular and molecular life sciences* 65: 862-894.
- Schröder, Martin and Randal J Kaufman 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 739-789.
- Schulte, Marc, Johannes Köster, Sven Rahmann and Alexander Schramm 2018. Cancer evolution, mutations, and clonal selection in relapse neuroblastoma. *Cell and tissue research* 372: 263-268.
- Seebode, Christina, Janin Lehmann and Steffen Emmert 2016. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies. *Anticancer research* 36: 1371-1378.
- Sepahvand, A., E. Studzińska-Sroka, P. Ramak and V. Karimian 2021. "Usnea sp.: Antimicrobial potential, bioactive compounds, ethnopharmacological uses and other pharmacological properties; a review article." *Journal of Ethnopharmacology* 268: 113656.
- Solárová, Z., Liskova, A., Samec, M., Kubatka, P., Büsselberg, D., & Solár, P. 2020. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. *Biomolecules*, 10(1), 87.
- Sharma, Reena, Sonal Sharma, Prashant Verma and Pravesh Yadav 2012. Proliferating trichilemmal tumor of scalp: benign or malignant, a dilemma. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 5: 213.
- Shen, X-G, C Wang, Y Li, L Wang, B Zhou, B Xu, X Jiang, Z-G Zhou and X-F Sun 2010. Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Disease* 12: 1213-1218.
- Sherif, Fatma, Wael A Mohamed and AS Mohra 2019. Skin lesion analysis toward melanoma detection using deep learning techniques. *International Journal of Electronics and Telecommunications* 65: 597-602.
- Sherr, Charles J 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677.
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Kun Wang, Xuyan Shi, Yue Wang, Huanwei Huang, Yinghua Zhuang, Tao Cai, Fengchao Wang and Feng Shao 2015. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526: 660-665.

- Shorfuzzaman, M. 2022. "An explainable stacked ensemble of deep learning models for improved melanoma skin cancer detection." *Multimedia Systems* 28(4): 1309-1323.
- Sinha, Tarini 2018. Tumors: Benign and malignant. *Cancer Therapy & Oncology International Journal* 10: 52-54.
- Singh, N., D. Baby, J. P. Rajguru, P. B. Patil, S. S. Thakkannavar and V. B. Pujari 2019. "Inflammation and cancer." *Annals of African medicine* 18(3): 121.
- Singh, N., D. Nambiar, R. K. Kale and R. P. Singh 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.
- Small, Sara, Ganesan Keerthivasan, Zan Huang, Sandeep Gurbuxani and John D Crispino 2010. Overexpression of survivin initiates hematologic malignancies in vivo. *Leukemia* 24: 1920-1926.
- Song, Yajuan, Fujun Dai, Dong Zhai, Yanmin Dong, Jing Zhang, Binbin Lu, Jian Luo, Mingyao Liu and Zhengfang Yi 2012. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis* 15: 421-432.
- Petrová, K., Bačkorová, M., Demčíšáková, Z., Petrovová, E., Goga, M., Vilková, M., Kello, M. 2022. Usnic Acid Isolated from *Usnea antarctica* (Du Rietz) Reduced In Vitro Angiogenesis in VEGF-and bFGF-Stimulated HUVECs and Ex Ovo in Quail Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *Life*, 12(9), 1444.
- Pfeffer, C. "SinghATK 2018. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- Sosnowski, Roman, Marc A Bjurlin, Paolo Verze, Cosimo De Nunzio, Shahrokh F Shariat, Maurizio Brausi and Nicholas M Donin 2016. Role of cigarette smoking in urological malignancies and clinical interventions for smoking cessation. *Central European Journal of Urology* 69: 366.
- Sperandio, S, K Poksay, I De Belle, MJ Lafuente, B Liu, J Nasir and DE Bredesen 2004. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death & Differentiation* 11: 1066-1075.
- Sporn, Michael B and Anita B Roberts 1985. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313: 745-747.
- Srinivasula, Srinivasa M and Jonathan D Ashwell 2008. IAPs: what's in a name? *Molecular cell* 30: 123-135.
- Stanojković, T. 2019. Investigations of lichen secondary metabolites with potential anticancer activity. *Lichen secondary metabolites*, Springer: 155-174.

- Sun, Bai-ling, En-bo Cai, Yan Zhao, Yu Wang, Li-min Yang and Jing-Yao Wang 2021a. Arctigenin triggers apoptosis and autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition in PC-3M cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*: c21-00021.
- Sun, Tong Xin, Ming Yue Li, Zhi Hong Zhang, Jing Ying Wang, Yue Xing, MyongHak Ri, Cheng Hua Jin, Guang Hua Xu, Lian Xun Piao and Hong Lan Jin 2021b. Usnic acid suppresses cervical cancer cell proliferation by inhibiting PD-L1 expression and enhancing T-lymphocyte tumor-killing activity. *Phytotherapy Research* 35: 3916-3935.
- Swanson, Paul E, Shirley B Carroll, Xia Fang Zhang and Michael A Mackey 1995. Spontaneous premature chromosome condensation, micronucleus formation, and non-apoptotic cell death in heated HeLa S3 cells. *Ultrastructural observations. The American journal of pathology* 146: 963.
- Szegezdi, E 2003. Fitzgerald U, and Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann NY Acad Sci* 1010: 186-194.
- Takai, Makoto, Yoshimasa Uehara and John A Beisler 1979. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *Journal of medicinal chemistry* 22: 1380-1384.
- Tannous, Zeina S, Martin C Mihm Jr, Arthur J Sober and Lyn M Duncan 2005. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *Journal of the American Academy of Dermatology* 52: 197-203.
- Tasset, Inmaculada and Ana Maria Cuervo 2016. Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *The FEBS journal* 283: 2403-2413.
- Tariq, A., S. Sadia, K. Pan, I. Ullah, S. Mussarat, F. Sun, O. O. Abiodun, A. Batbaatar, Z. Li and D. Song 2017. "A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants." *Phytotherapy Research* 31(2): 202-264.
- Taş, İ., J. Han, S.-Y. Park, Y. Yang, R. Zhou, C. D. Gamage, T. Van Nguyen, J.-Y. Lee, Y. J. Choi and Y. H. Yu 2019. "Physciosporin suppresses the proliferation, motility and tumourigenesis of colorectal cancer cells." *Phytomedicine* 56: 10-20.
- Tata, JR 1966. Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Developmental biology* 13: 77-94.
- Tchoghandjian, Aurelie, Claudia Jennewein, Ines Eckhardt, Krishna Rajalingam and Simone Fulda 2013. Identification of non-canonical NF- κ B signaling as a critical mediator of Smac mimetic-stimulated migration and invasion of glioblastoma cells. *Cell death & disease* 4: e564-e564.
- Thompson, Matthew P and Razelle Kurzrock 2004. Epstein-Barr virus and cancer. *Clinical cancer research* 10: 803-821.

- Tonnus, Wulf, Claudia Meyer, Alexander Paliege, Alexia Belavgeni, Anne von Mässenhausen, Stefan R Bornstein, Christian Hugo, Jan Ulrich Becker and Andreas Linkermann 2019. The pathological features of regulated necrosis. *The Journal of pathology* 247: 697-707.
- Travers, Kevin J, Christopher K Patil, Lisa Wodicka, David J Lockhart, Jonathan S Weissman and Peter Walter 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249-258.
- Tsao, Hensin, Lynda Chin, Levi A Garraway and David E Fisher 2012. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes & development* 26: 1131-1155.
- Tse, Janet M, Gang Cheng, James A Tyrrell, Sarah A Wilcox-Adelman, Yves Boucher, Rakesh K Jain and Lance L Munn 2012. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 911-916.
- Tsujimoto, Yoshihide, Lawrence R Finger, Jorge Yunis, Peter C Nowell and Carlo M Croce 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science* 226: 1097-1099.
- Uddin, Mohammad Nizam, Naomi Nishio, Sachiko Ito, Haruhiko Suzuki and Ken-ichi Isobe 2012. Autophagic activity in thymus and liver during aging. *Age* 34: 75-85.
- Vaux, David L and John Silke 2003. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 304: 499-504.
- Vignon, Franchise, Françoise Capony, Monique Ghambon, Gilles Freiss, Marcel Garcia and Henri Rochefort 1986. Autocrine growth stimulation of the MCF 7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52 K protein. *Endocrinology* 118: 1537-1545.
- Vikhanskaya, Faina, Ming Kei Lee, Marco Mazzeletti, Massimo Broggin and Kanaga Sabapathy 2007. Cancer-derived p53 mutants suppress p53-target gene expression—potential mechanism for gain of function of mutant p53. *Nucleic acids research* 35: 2093-2104.
- Vitale, Ilio, Lorenzo Galluzzi, Maria Castedo and Guido Kroemer 2011. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 385-392.
- Vogelstein, Bert and Kenneth W Kinzler 1993. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics* 9: 138-141.
- Vogt, Carl and Karl Christoph Vogt 1842. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*): Jent & Gassmann.

- Vucic, Domagoj and Wayne J Fairbrother 2007. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clinical cancer research* 13: 5995-6000.
- Wainscoat, JS and MF Fey 1990. Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Research* 50: 1355-1360.
- Wang, J., H. J. Chun, W. Wong, D. M. Spencer and M. J. Lenardo 2001. "Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(24): 13884-13888.
- Wang, Hanxue, Min Xuan, Cheng Huang and Changhong Wang 2022. Advances in Research on Bioactivity, Toxicity, Metabolism, and Pharmacokinetics of Usnic Acid In Vitro and In Vivo. *Molecules* 27: 7469.
- Wang, Man, Shuai Jiang, Yinfeng Zhang, Peifeng Li and Kun Wang 2019. The multifaceted roles of pyroptotic cell death pathways in cancer. *Cancers* 11: 1313.
- Wang, Miao and Randal J Kaufman 2014. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature reviews cancer* 14: 581-597.
- Wang, Shiyu and Randal J Kaufman 2012. The impact of the unfolded protein response on human disease. *Journal of Cell Biology* 197: 857-867.
- Ward, William H, Fernando Lamberton, Neha Goel, Q Yu Jian and Jeffrey M Farma 2017. Clinical presentation and staging of melanoma. *Exon Publications*: 79-89.
- Wei, Yunbo, Tingjun Fan and Miaomiao Yu 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40: 278-288.
- Weinberg, RA and Douglas Hanahan 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Weyhenmeyer, B, AC Murphy, JHM Prehn and BM Murphy 2012. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Experimental oncology*.
- Witsch, Esther, Michael Sela and Yosef Yarden 2010. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*.
- Wong, Rebecca SY 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30: 1-14.
- Woodhouse, Elisa C, Rodrigo F Chuaqui and Lance A Liotta 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 80: 1529-1537.
- Wright, Casey W and Colin S Duckett 2005. Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *The Journal of clinical investigation* 115: 2673-2678.

- Wu, Y., D. Zhao, J. Zhuang, F. Zhang and C. Xu 2016. "Caspase-8 and caspase-9 functioned differently at different stages of the cyclic stretch-induced apoptosis in human periodontal ligament cells." *PLoS One* 11(12): e0168268.
- Wu, Y., D. Gan, X. Leng, W. He, X. Zhang, C. Li, X. Gu, Y. Hu, S. Du and Y. Han (2022). "Anti-ageing and Anti-lung Carcinoma Effects of Vulpinic Acid and Usnic Acid Compounds and Biological Investigations with Molecular Modeling Study." *Journal of Oleo Science* 71(2): 247-255.
- Wuilleme-Toumi, S, N Robillard, P Gomez, P Moreau, S Le Gouill, H Avet-Loiseau, JL Harousseau, M Amiot and R Bataille 2005. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 19: 1248-1252.
- Yakkanti, Raja Ratna Reddy, Manisha Singh, Vasanti Kabra, P Chandra Sekhar, K SreejaVamsi, B Ramachandra Reddy, S Ramamoorthy and C Damodar Reddy 2018. Limonene and BEZ 235 induce apoptosis in COLO-320 and HCT-116 colon cancer cells. *International Journal of Drug Delivery* 10: 19-24.
- Yan, Z., Z. Lai and J. Lin 2017. "Anticancer properties of traditional Chinese medicine." *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 20(5): 423-429.
- Yang, Lily, Zehong Cao, Hui Yan and William C Wood 2003. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Research* 63: 6815-6824.
- Yang, Y., T. T. Nguyen, M.-H. Jeong, F. Crişan, Y. H. Yu, H.-H. Ha, K. H. Choi, H. G. Jeong, T. C. Jeong and K. Y. Lee (2016). "Inhibitory activity of (+)-usnic acid against non-small cell lung cancer cell motility." *PloS one* 11(1): e0146575.
- Yangin, S., D. Cansaran-Duman, G. G. Eskiler and S. Aras 2022. "The molecular mechanisms of vulpinic acid induced programmed cell death in melanoma." *Molecular Biology Reports* 49(9): 8273-8280.
- Yorimitsu, Tomohiro, Usha Nair, Zhifen Yang and Daniel J Klionsky 2006. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 281: 30299-30304.
- Youn, Myung-Ja, Jin-Kyung Kim, Seong-Yeol Park, Yunha Kim, Se-Jin Kim, Jin Seok Lee, Kyu Yun Chai, Hye-Jung Kim, Ming-Xun Cui and Hong Seob So 2008. Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) induces G0/G1 arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World journal of gastroenterology: WJG* 14: 511.
- Yu, ZaiFang, Hong Luo, Weiming Fu and Mark P Mattson 1999. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Experimental neurology* 155: 302-314.
- Yuan, Shujun and Christopher W Akey 2013. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 21: 501-515.

- Yurdacan, B., U. Egeli, G. G. Eskiler, I. Eryilmaz, G. Cecener and B. Tunca 2019. "The role of usnic acid-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma." *Human & experimental toxicology* 38(2): 201-215.
- Zhang, Huan, Juan Xing, Zhujiang Dai, Daorong Wang and Dong Tang 2022. Exosomes: the key of sophisticated cell–cell communication and targeted metastasis in pancreatic cancer. *Cell Communication and Signaling* 20: 1-11.
- Zhang, Pengchao, Chenhe Su, Zhangtao Jiang and Chunfu Zheng 2017. Herpes simplex virus 1 UL41 protein suppresses the IRE1/XBP1 signal pathway of the unfolded protein response via its RNase activity. *Journal of Virology* 91: e02056-02016.
- Zhao, Pengfei, Meng Wang, Mian Chen, Ze Chen, Xiao Peng, Feifan Zhou, Jun Song and Junle Qu 2020. Programming cell pyroptosis with biomimetic nanoparticles for solid tumor immunotherapy. *Biomaterials* 254: 120142.
- Ziegler, U and P Groscurth 2004. Morphological features of cell death. *Physiology* 19: 124-128.