KÜÇÜK MOLEKÜL YAPILI DOĞAL BİLEŞİKLERİN TÜMÖR GELİŞİMİ VE YAYILIMINDA YENİ DAMAR OLUŞUMU HEDEFLİ TEDAVİ POTANSİYELLERİNİN EPİGENETİK YAKLAŞIM VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARLA İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Mehmet VAROL

Eskişehir - 2017

KÜÇÜK MOLEKÜL YAPILI DOĞAL BİLEŞİKLERİN TÜMÖR GELİŞİMİ VE YAYILIMINDA YENİ DAMAR OLUŞUMU HEDEFLİ TEDAVİ POTANSİYELLERİNİN EPİGENETİK YAKLAŞIM VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARLA İNCELENMESİ

Mehmet VAROL

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL
(İkinci Danışman: Doç. Dr. Miriş DİKMEN)

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Ocak, 2017

Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi BAP Komisyonunca kabul edilen 1505F426 ve 1502F068 no.lu projeler kapsamında ve 1649B031503284 başvuru numarasıyla TÜBİTAK 2211-c Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet VAROL' un "**Küçük Molekül Yapılı Doğal Bileşiklerin Tümör Gelişimi ve Yayılımında Yeni Damar Oluşumu Hedefli Tedavi Potansiyellerinin Epigenetik Yaklaşım ve Moleküler Mekanizmalarla İncelenmesi**" başlıklı tezi ……./……./……... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

		Ünvanı -Adı Soyadı	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	**:**	**Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL**	**……..**
Üye	**:**	**Prof. Dr. Hülya SİVAS**	**……..**
Üye	**:**	**Prof. Dr. Mediha CANBEK**	**……..**
Üye	**:**	**Doç. Dr. Reşat ÜNAL**	**……..**
Üye	**:**	**Yrd. Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK**	**……..**

……..

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Nedim DEĞİRMENCİ

ÖZET

KÜÇÜK MOLEKÜL YAPILI DOĞAL BİLEŞİKLERİN TÜMÖR GELİŞİMİ VE YAYILIMINDA YENİ DAMAR OLUŞUMU HEDEFLİ TEDAVİ POTANSİYELLERİNİN EPİGENETİK YAKLAŞIM VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARLA İNCELENMESİ

Mehmet VAROL

Biyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocak, 2017

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

(İkinci Danışman: Doç. Dr. Miriş DİKMEN)

Likenler; mantar ve alglerin birliktelikleri sonucu oluşmuş simbiyotik ortaklıklardır ve bu birliktelik içinde kurulan ileri seviyeli metabolik ilişki sayesinde, 1000'den fazla özgün liken bileşiği sentezlenmektedir. Liken bileşiklerinin; anti-inflamatuar, anti-pretik, analjezik, ultraviyole koruyucu, enzim baskılayıcı, sitotoksik vb. aktiviteleri hakkında çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, anjiyojenez üzerine aktiviteleri hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte, mevcut kan damarlarından yeni kılcal damarların oluşması olarak tanımlanan anjiyojenezin; kanser tedavisinde ve tümör hücrelerinin büyümesi, gelişmesi, doku oluşturmaları ve metastaz olgularında önemli bir hedef olduğu değerlendirilmektedir.

Bu nedenle, alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit isimli liken bileşiklerinin sağlıklı ve kanserli hücre hatları üzerine sitotoksik aktiviteleri; MTT ve Alamar Blue hücre canlılığı, LDH hücre membran bütünlüğü ve PicoGreen dsDNA miktar ölçümü testleri kullanılarak belirlenmiş ve zamana bağlı sitotoksik aktiviteleri xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz MP (RTCA-MP) cihazı kullanılarak aydınlatılmıştır. Anjiyojenez ve endotel hücre göçü üzerine aktiviteleri ise sırasıyla; endotel hücre tüp formasyon testi ve RTCA DP cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca; reaktif oksijen türleri birikimi, oksidatif DNA hasarı, hücre adezyonu, tümör hücre invazyonu ve DNA metilasyonu üzerine aktiviteleri de araştırılmıştır. Kaperatik asit; düşük toksik aktivitesi ve yüksek anti-anjiyojenik aktivitesi nedeniyle en etkili bileşik olarak ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte, sağlıklı ve kanserli hücrelerin kullanılmasıyla gerçekleştirilen deneyler sonucunda, izole edilen bileşiklerin tamamının kanser tedavisi için umut vaat edici özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Liken, kanser ve anjiyojenez, gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA), oksidatif DNA hasarı, DNA metilasyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANGIOGENESIS-TARGETED TREATMENT POTENTIALS OF THE SMALL MOLECULE STRUCTURED NATURAL COMPOUNDS BY EPIGENETIC APPROACH AND MOLECULAR MECHANISMS ON TUMOR DEVELOPMENT AND INVASION

Mehmet VAROL

Department of Biology

Anadolu University, Graduate School of Science, January, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

(Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Miriş DİKMEN)

Lichens are symbiotic associations, formed as a result of a participation of fungus and algae, and more than 1000 unique compounds can be synthesized due to the advanced metabolic relationship within this association. Although there are a lot of studies about anti-inflammatory, anti-pyretic, analgesic, ultraviolet protective, enzyme inhibitor, cytotoxic etc. activities of the lichen compounds, there are a few studies about their activities on angiogenesis. However, angiogenesis is defined as the formation of new capillaries from existing blood vessels, considered as an important target in cancer treatment and the growth, development, tissue formation and metastasis of tumor cells.

Therefore; cytotoxic activities of the lichen compounds named alectoronic acid, collatolic acid and caperatic acid on healthy and cancer cell lines; were determined by using MTT and Alamar Blue cell viability, LDH cellular membrane integrity and PicoGreen dsDNA quantitation assays, and their time-dependent toxicities were lighted up by using xCELLigence Real Time Cell Analysis MP (RTCA-MP) instrument. Their activities on angiogenesis and endothelial cell migration were determined by using endothelial tube formation assay and RTCA DP instrument, respectively. Furthermore, the activities on reactive oxygen species accumulation, oxidative DNA damage, cell adhesion, tumor cell invasion and DNA methylation were also investigated. Caperatic acid takes over as a most effective compound due to its low cytotoxicity and high anti-angiogenic activity. However, it has been determined, as a result of the accomplished experiments by using healthy and cancerous cells, that the all isolated compounds are promising for cancer treatment.

Keywords: Lichen, cancer and angiogenesis, real time cell analysis (RTCA), oxidative DNA damage, DNA methylation.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresinde laboratuvarını bana açarak tasarladığım her türlü proje ve çalışmada bana maddi, manevi, akademik desteğini esirgemeyen ve ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olduğunu hissettiren sevgili hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL' a,

Tez çalışmama paralel bir proje tasarlamamıza öncülük ederek yürütücülüğünü üstlenen Sayın Doç. Dr. Mehmet CANDAN' a, bu projede görev almayı kabul ederek bilgi, birikim ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ayşen TÜRK' e ve yine bu projede kapsamında araştırmacı olarak görev almayı kabul ederek likenlerden saf bileşik elde edilmesini sağlayan Sayın Doç. Dr. Turgay TAY ile Yrd. Doç. Dr. İlker AVAN' a,

Tez çalışmam sırasında laboratuvarını bana açan ve çalışmalarımın bir kısmını yürütmemde desteğini, bilgisini ve güler yüzünü esirgemeyen ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Miriş DİKMEN' e,

Tez çalışmam için 1505F426 ve 1502F068 numaralı projeler kapsamında maddi destek sağlayan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna, 2211-c Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt Içi Doktora Burs Programı kapsamında 1649B031503284 başvuru numarasıyla destek sağlayan TÜBİTAK' a ve çalışmalarımı sürdürebilmem için araştırma izni veren Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Rektörlük, Fen Fakültesi Dekanlığı ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde görevli saygıdeğer hocalarıma,

Doktora öğrenimim süresince bana destek olan, yol gösteren ve yön veren Anadolu Üniversitesi ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesinde görevli bütün hocalarıma, araştırma görevlilerine ve bölüm çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreç boyunca hep yanımda olan annem Döne VAROL' a ve deneysel çalışmalarda yardımcı olarak tezime ve diğer projelere akademik katkı sağlayan kardeşim Ayşegül VAROL' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Babam Alaattin VAROL' a...

Mehmet VAROL

Ocak, 2017

…….../……/…….

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Mehmet VAROL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI ..... **i**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ..... **ii**

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

TEŞEKKÜR ..... **v**

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xv**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kanser **1**

1.2. Anjiyojenez **3**

1.3. Tümör Mikro Çevresi ve Anjiyojenez **7**

1.4. Tümör Anjiyojenezi ve Metastaz **22**

1.4.1. Matriks metalloproteinazlar ve ekstrasellüler matriksin parçalanması **25**

1.4.2. Hücre göçü (migrasyon) **28**

1.4.3. Tümör hücresi yayılımı (invazyon) **30**

1.4.4. Hücre adezyonu **32**

1.5. Küçük Molekül Yapılı Doğal Bileşik Kaynakları Olarak Likenler **33**

2. MATERYAL VE YÖNTEM **39**

Sayfa

2.1. Küçük Molekül Yapılı Doğal Bileşiklerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu 39

2.2. Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması 40

2.3. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Kültür Koşulları 42

2.3.1. İnsan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D) hücre kültürü 42

2.3.2. İnsan meme bezi epitelyum IV. aşama adenokarsinoma (HCC1428) hücre kültürü 42

2.3.3. İnsan göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücre kültürü 43

2.4. MTT Hücre Canlılığı Testi 43

2.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA MP) Kullanılarak Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi 45

2.6. Endotel Hücre Tüp Formasyon Testi 47

2.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Endotel Hücre Migrasyonunun İncelenmesi 47

2.8. Tümör Hücresi Yayılım (İnvazyon) Testi 48

2.9. Hücre Adezyon Testi 49

2.10. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Birikiminin Ölçümü 50

2.11. 8-hidroksideoksiguanozine (8-OHdG) Eliza Testi 52

2.12. Hücrelerin Epigenetik Özellikleri Üzerine Aktivitelerin Belirlenmesi 53

3. BULGULAR 55

3.1. MTT Hücre Canlılığı Belirleme Testi Sonuçları 55

3.2. Liken Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemiyle (RTCA MP) Belirlenmesi 59

3.2.1. Alektoronik asit 59

3.2.2. Kollatolik asit 64

Sayfa

3.2.3. Kaperatik asit 68

3.3. Endotel Hücre Tüp Formasyon Testi Sonuçları 72

3.4. Liken Bileşiklerinin Endotel Hücre Göçü Üzerine Etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Belirlenmesi 74

3.5. Liken Bileşiklerinin Tümör Hücrelerinin Yayılımı (İnvazyonu) Üzerine Aktiviteleri 78

3.6. Liken Bileşiklerinin Hücrelerin Adezyon Yeteneği Üzerine Aktiviteleri 82

3.7. Liken Bileşiklerinin Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Birikimi Üzerine Etkileri 84

3.8. Liken Bileşiklerinin Oksidatif DNA Hasarı Üzerine Aktivitelerinin 8-hidroksideoksiguanozine (8-OHdG) Eliza Testi Kullanılarak Belirlenmesi 86

3.9. Liken Bileşiklerinin Hücrelerin Epigenetik Özellikleri Üzerine Aktivitelerin Belirlenmesi 88

4. TARTIŞMA VE SONUÇ 90

KAYNAKLAR 99

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Anjiyojenezi tetikleyici faktörler ve fonksiyonları **5**

Tablo 1.2. Anjiyojenezi baskılayıcı faktörler ve fonksiyonları..... **6**

Tablo 3.1. Alektoronik asit bileşiğinin 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri **60**

Tablo 3.2. Kollatolik asit bileşiğinin 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri **64**

Tablo 3.3. Kaperatik asit bileşiğinin 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri **68**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Tümör dokusunu oluşturan hücrelerin anjiyojenez tetikleyici bir faktör olan VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) üretimi sonucu anjiyojenez oluşumu ve tümör dokusunun damarlı bir form kazanması **3**

Şekil 1.2. Reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar moleküller arasındaki denge **12**

Şekil 1.3. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve muhtemel hücresel cevaplar **13**

Şekil 1.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS), VEGF eşlikli ve VEGF'den bağımsız olarak, anjiyojenezi etkileme mekanizmaları **17**

Şekil 1.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre kaderi üzerine aktiviteleri. **21**

Şekil 1.6. Hipoksi nedeniyle tetiklenen tümör anjiyojenezi ve metastaz süreçleri. **22**

Şekil 1.7. Tümör hücrelerinin metastazı ve metastatik doku oluşum süreci **23**

Şekil 1.8. Tümör dokusunun gelişimi, makrometastaz ve mikrometastaz süreçleri **24**

Şekil 1.9. Matriks metalloproteinaz enzimlerinin genel yapısı ve tipleri **25**

Şekil 1.10. Bir liken yapısın diyagram olarak gösterimi. **35**

Şekil 1.11. Küçük molekül yapılı liken bileşiklerinin sentez yolakları **36**

Şekil 2.1. Likenlerden izole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları (2D ve 3D) ve izole edildikleri likenler **41**

Şekil 2.2. MTT tetrozolium ve formazan tuzlarının kimyasal yapısı **44**

Şekil 2.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) MP modeli tanıtımı ve çalışma prensibi. **46**

Şekil 2.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) DP modeli ve CIM-16 kodlu plakanın parçaları. **48**

Şekil 2.5. DCF-DA molekülünün hücre içindeki metabolizması ve ROS aktivitesi sonucu DCF oluşumu. **51**

Sayfa

Şekil 3.1. Alektoronik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine aktivitesinin MTT test yöntemiyle belirlenmesi **56**

Şekil 3.2. Kollatolik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine aktivitesinin MTT test yöntemiyle belirlenmesi **57**

Şekil 3.3. Kaperatik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine aktivitesinin MTT test yöntemiyle belirlenmesi **58**

Şekil 3.4. Alektoronik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi..... **61**

Şekil 3.5. Alektoronik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenen konsantrasyon-normalleştirilmiş hücre indeksi bağımlı IC_{50} eğrileri. **62**

Şekil 3.6. Alektoronik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin geçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi sonucu elde edilen, zamana bağlı IC_{50} eğrileri. **63**

Şekil 3.7. Kollatolik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi..... **65**

Sayfa

Şekil 3.8. Kollatolik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenen konsantrasyon-normalleştirilmiş hücre indeksi bağımlı IC_{50} eğrileri. **66**

Şekil 3.9. Kollatolik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin geçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi sonucu elde edilen, zamana bağlı IC_{50} eğrileri. **67**

Şekil 3.10. Kaperatik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi..... **69**

Şekil 3.11. Kaperatik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenen konsantrasyon-normalleştirilmiş hücre indeksi bağımlı IC_{50} eğrileri. **70**

Şekil 3.12. Kaperatik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin geçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi sonucu elde edilen, zamana bağlı IC_{50} eğrileri. **71**

Şekil 3.13. Likenlerden izole edilen küçük molekül yapılı bileşiklerin toksik olmayan konsantrasyonlarının anti-anjiyojenik aktivitelerinin HUVEC endotelyal tüp formasyon testi ile belirlenmesi **73**

Şekil 3.14. Alektoronik asit bileşiğinin; HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak belirlenen zamana ve konsantrasyona bağlı değişim grafikleri. **75**

Sayfa

Şekil 3.15. Kollatolik asit bileşiğinin; HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak belirlenen zamana ve konsantrasyona bağlı değişim grafikleri. **76**

Şekil 3.16. Kaperatik asit bileşiğinin; HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak belirlenen zamana ve konsantrasyona bağlı değişim grafikleri. **77**

Şekil 3.17. Liken bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarının; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma hücrelerinin yayılımı (invazyonu) üzerine etkilerinin belirlenmesi **79**

Şekil 3.18. Liken bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarının; HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma hücrelerinin yayılımı (invazyonu) üzerine etkilerinin belirlenmesi **80**

Şekil 3.19. Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma ve HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma hücrelerinin yayılımı (invazyonu) üzerine etkileri.. ..... **81**

Şekil 3.20. Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin adezyonu üzerine etkileri. **82**

Şekil 3.21. Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktiviteleri. **85**

Şekil 3.22. Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinde oksidatif DNA hasarı oluşturma kapasiteleri. **87**

Şekil 3.23. Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin DNA metilasyon oranları üzerine aktiviteleri..... **89**

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANG1 : Anjiyopoietin 1

ASC : Askorbat

A549 : İnsan akciğer adenokarsinoma hücresi

bFGF : Bazik fibroblast büyüme faktörü

CAM : Korioallantoik membran

CCL2 : C-C motifi kemokin ligandı-2

COX-2 : Siklooksijenaz-2

CD31 veya PECAM : Trombosit endotel hücre adezyon molekülü

DMSO : Dimetil sülfoksit

dsDNA : Çift zincirli DNA

EBM-2 : Endotel hücre büyüme medyumu

ECM : Ekstrasellüler matriks

EGF : Epidermal büyüme faktörü

ETS : Elektron taşıma sistemlerinin

FBS : Fetal bovin serum

FGF : Fibroblast büyüme faktörü

FT-IR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

GSH : İndirgenmiş glutatyon

HCC1428 : İnsan meme epitelyum 4.aşama adenokarsinoma hücresi

Hep G2 : İnsan karaciğer hepatokarsinoma hücresi

HGF : Hepatosit büyüme faktörü

HIF : Hipoksiyle indüklenen transkripsiyon faktörlerin

HUVEC : İnsan göbek bağı damar endotel hücresi

ICAM-1 : sitokinler tarafından salgılanması uyarılabilen hücre içi adezyon molekülü-1

IL-4 **:** İnterlökin-4

INF-α **:** İnterferon-α

İTK veya TLC **:** ince tabaka kromatografisinde

LDH **:** Laktat dehidrogenaz

LOX **:** Lizil oksidaz

MCP **:** Monosit kemoatraktan protein

MMP **:** Matriks metalloproteinazlar

NADPH **:** Dihidronikotinamid-adenin dinükleotid fosfat

NEM **:** N-Etilmaleimide

NOS **:** Nitrik oksit sentaz

NOX **:** NADPH oksidaz

NS20Y **:** Fare neuroblastoma hücresi

NRP **:** Nöropilin

PAI **:** Plazminojen aktivatör inhibitör

PBS **:** Fosfatlanmış tuz solüsyonu

PIGF **:** Plasental büyüme faktörü

PRX **:** Peroksiredoksinler

PUFA **:** Fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asidi

Rf faktörü **:** Alıkonma faktörü

ROS **:** Reaktif oksijen türlerinin

RTCA **:** Gerçek zamanlı hücre analiz sistemleri

SPARC **:** Asidik ve sistein amino asidince zengin salgılanan protein

TGF **:** Dönüştürücü büyüme faktörü

Tie2 **:** ANG1 reseptörü

TIMP **:** Metaloproteinazların doku inhibitörleri

TLR **:** Toll benzeri reseptör

TNF **:** Tümör nekroz faktör

TOC **:** Tokoferoller

TRX **:** Tiyoredoksinler

TSP **:** Trombospondin

VCAM **:** Vasküler hücre adezyon molekülü

VEGI **:** Vasküler endotelyal büyüme inhibitörü

VEGF **:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR **:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

VE kaderin **:** Vasküler endotelyal kaderin

T-47D **:** İnsan meme epitelyum duktal karsinoma

5-mC **:** 5'-metilsitozin

8-OHdG **:** 8- hidroksideoksiguanozine

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kontrolsüz hücre çoğalması ve anormal özellikler sergileyen hücrelerin sayısında meydana gelen artış ile karakterize edilebilen bir grup hastalık olarak tanımlanan kanser; yüzyıllar öncesinde olduğu gibi günümüzde de kritik önemini korumaktadır (Atıcı 2007). Firavun dönemi papirüslerinde, Babil çivi yazısı tabletlerinde ve eski Hint yazmalarında kanser ile ilgili tanımlamaların bulunduğuna dair kanıtlar olmakla birlikte antik Yunan kaynaklarında ve Galen'in çalışmalarında farklı karakteristik özelliklere sahip kanser vakalarının anlatımlarıyla karşılaşılmakta; ancak bu kanser tipleri hakkında çoğunlukla yorum yapılamamaktadır (Sigerist 1960, Atıcı 2007, Nobili vd. 2009).

İnsanlık tarihinin en eski ve üzerine en fazla araştırma yapılan hastalıklardan biri olan kanser; günümüz dünyasında da en önemli ölüm sebeplerinin başında gelmekte ve bu nedenle de kanser tedavisine yönelik araştırmalar ulusal ve uluslararası kuruluşlar tarafından finanse edilerek öncelikli araştırma alanları içinde değerlendirilmektedir (Siegel vd. 2015, Varol 2016b). Kanser istatistikleriyle ilgili yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen veriler de, kanser araştırmalarını destekleyen kurum ve kuruluşların bu politikalarının doğruluğunu ve kanser araştırmalarının önemini ortaya koymaktadır (Rahib vd. 2014, Siegel vd. 2015). Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2010) 2030 yılında, dünya çapında, her yıl 15.5 milyon kişiye kanser teşhisi konulması beklediklerini belirten bir rapor sunarken; Araştırmacı İlaç Firmaları Derneği de (AİFD, 2011) her yıl 160 bin vatandaşımıza kanser teşhisi konulduğunu ve 100 bin vatandaşımızın da kanser nedeniyle yaşamını yitirdiğini açıklamıştır (Kavradim vd. 2013).

Kanser ve tümör oluşumunun, zararlı çevresel etmenlerin öncülüğünde başlayan çok aşamalı ve uzun bir süreç olduğu açıkça bilinmektedir (Chaffer ve Weinberg 2015). Kanser oluşum süreci; organizma içindeki bazı hücrelerin mikro çevrede oluşan stres neticesinde normal yapılarının habis bir değişme uğramasıyla (malign transformasyon) başlamakta ve hızlı hücre çoğalması (hiperproliferasyon), büyüme baskılayıcı faktörlere duyarsızlık oluşumu (evazyon), programlı hücre

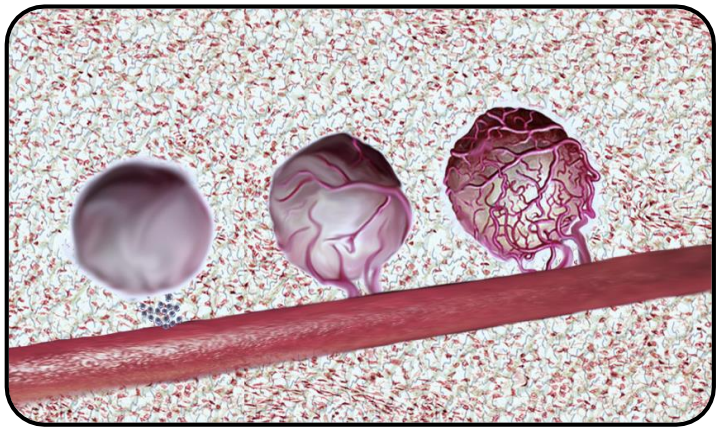
ölümüne (apoptoz) karşı direnç kazanımı, yayılımcı (invaziv) potansiyele sahip olma, mevcut kan damarlarından yeni kılcal damar oluşumunu (anjiyojenez) başlatıcı faktörlerin üretilmesi ve nihayetinde tümör anjiyojenezi sonucu oluşan bu damarlar aracılığıyla organizmanın farklı bölgelerine ulaşma yeteneği olarak tanımlanan metastaz yapabilme yeteneğini kazanma şeklinde devam etmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000, Hanahan ve Weinberg 2011). Hücresel enerji akışında düzensizlikler oluşması ve immün sistemden kaçış da kanserleşme sürecinin birer parçası olarak tanımlanmıştır (Hanahan ve Weinberg 2011, Voron vd. 2014). Ayrıca, kanserleşme sürecinde birçok epigenetik değişimin gerçekleştiği de bilinmektedir (Martín-Subero ve Esteller 2017). Bu değişimlerden biri olan DNA metilasyonu; memeli hücrelerinde, genellikle gen promotorları olarak görev alan, CpG dinükleotid bölgelerinde meydana gelmektedir. Kanser gibi olguların gelişiminde; DNA metilasyonunda görevli olan DNA metil transferaz enzimlerinin aktivitesinde düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Riggs ve Jones 1983). Malignant özelliğe bağlı olarak DNA metilasyonunda azalma meydana geldiği ve aktif olmayan gen bölgelerinin açılarak aktive edildiği bilinmektedir (Gama-Sosa vd. 1983).

Kanserleşme süreçlerinin birbirine benzer özelliklere sahip olmasına rağmen günümüzde 200'den fazla farklı kanser tipi olduğu bilinmektedir (Hansen vd. 2011). Ayrıca, kanserli bir dokunun; farklı mutasyon, epigenetik profil ve karaktere sahip çeşitli kanser hücrelerinden oluştuğu, morfolojik ve fonksiyonel olarak heterojen bir yapı sergilediği de yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Meacham ve Morrison 2013). Tüm bu sebepler nedeniyle, cerrahi müdahale, ışın tedavisi (radyoterapi), kimyasal tedavi (kemoterapi), hormon terapisi gibi geleneksel kanser tedavi yöntemlerinde, kanserli hücreler tedaviye karşı direnç geliştirebilmekte, daha saldırgan bir yapı sergileyerek hastaların yaşam kalitesinde düşüşe neden olabilmekte ve hatta hızlı bir şekilde yaşam süresinin kısalmasına yol açabilmektedir (DeVita Jr ve Rosenberg 2012, Siegel vd. 2012, DeSantis vd. 2014, Siegel vd. 2015). Bu nedenle, kanser oluşum süreci ve farklı kanser tiplerinin ortak özellikleri üzerine odaklanan tedavi yöntemlerinin veya ilaçlarının geliştirilmesi daha faydalı ve sürdürülebilir gözükmektedir ki yukarıda bahsedilen tümör oluşum süreçleri içinde yer alan tümör anjiyojenezi de kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak karşımıza çıkmaktadır (Carmeliet ve Jain 2000).

1.2. Anjiyojenez

Memeli hücreleri yaşamlarını devam ettirebilmek için besin ve oksijene ihtiyaç duymakla birlikte yaşamsal faaliyetlerinin bir sonucu olarak oluşan metabolik atıklarını da uzaklaştırmak zorundadırlar (Carmeliet ve Jain 2000). Oksijenin doku içindeki difüzyonunun yaklaşık olarak 100-200 μm mesafe ile sınırlı olduğu bilinmektedir (Groebe ve Vaupel 1988, Olive vd. 1992, Grimes vd. 2014, Wenger vd. 2015). Dolayısıyla memeli hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerine homeostaz dahilinde devam edebilmeleri için kan damarlarına olan uzaklıklarının 200 μm mesafeden daha az olması gerekmekte, aksi bir durumda ise hücrelerde ve doku içinde stres oluşmakta, oluşan bu stresin bir sonucu olarak da farklı hücre içi ve hücreler arası sinyal mekanizmaları devreye girerek mevcut kan damarlarından yeni kılcal damarlarının oluşması olarak tanımlanan anjiyojenez tetiklenebilmektedir (Carmeliet ve Jain 2000).

Tümör dokularını oluşturan hücreler de sağlıklı dokuları oluşturan hücreler gibi yaşamsal faaliyetlerine devam edebilmek, tümör dokusunun kütlesini ve hacmini arttırabilmek, sayısal artışlarını sürdürebilmek ve bulundukları organizmanın farklı bölgelerine göç ederek metastaz yapabilmek için yeni kan damarlarının oluşmasına ihtiyaç duymakta ve anjiyojenez sürecini başlatıcı faktörleri üreterek yeni kılcal damarların kendi etraflarında ve doku içerisinde oluşumunu sağlayabilmektedirler (Şekil 1.1) (Weis ve Cheresh 2011).



Şekil 1.1. *Tümör dokusunu oluşturan hücrelerin anjiyojenez tetikleyici bir faktör olan VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) üretimi sonucu anjiyojenez oluşumu ve tümör dokusunun damarlı bir form kazanması*

Tümör dokularının etrafında anjiyojenezin meydana geldiğinin ve dokunun yeni kılcal damarlarla sarıldığının belirlenmesi üzerinden 100 yıldan fazla zaman geçmiştir (Goldmann 1907, Ide vd. 1939, Algire vd. 1945). 1968'li yıllarda ise tümör dokularının etrafındaki yeni kılcal damarların varlığı; tümör hücreleri tarafından salgılanan ve difüze olabilme yeteneğindeki anjiyojenik bileşenlerin yani anjiyojenezi tetikleyen moleküllerin varlığına dayandırıldığı bir hipotez ile açıklanmaya çalışılmıştır (Ehrmann ve Knoth 1968, Greenblatt ve Philippe 1968). Daha sonraki yıllarda ise anjiyojenezin, tümör gelişimini engellemek için önemli bir hedef olabileceği ve tümör metastazının da anjiyojenez bağımlı bir süreç olduğu düşüncesi Judah Folkman tarafından 1971 yılında öne sürülmüştür (Folkman 1971).

Folkman tarafından öne sürülen anjiyojenez bağımlı tümör gelişimi hipotezi 1976 yılında Gullino tarafından, henüz kanserleşmemiş dokularda bulunan hücrelerin, kanserli doku oluşturma yolunda, anjiyojenezi tetikleyici kapasiteleri olduğunun belirlenmesi ile kanıtlanmış ve bu kapasitenin baskı altına alınmasının kanser gelişimini engellemek için önemli bir strateji olabileceği öne sürülmüştür (Gullino 1978). Daha sonra yapılan araştırmalar ışığında Folkman'ın hipotezi genetik yaklaşımlarla da desteklenerek açıklanmıştır (Carmeliet ve Jain 2000, Hanahan ve Weinberg 2000, Weis ve Cheresh 2011). Günümüzde anjiyojenezi tetikleyici (pro-anjiyojenik) faktörler (Tablo 1.1) ile anjiyojenezi baskılayıcı (anti-anjiyojenik) faktörlerin (Tablo 1.2) varlığı ve bunların doku mikro çevresinde bulunan miktarları arasında bir denge olduğu kesin olarak bilinmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000). Bu dengede meydana gelen değişimler ise anjiyojenik anahtarın (switch) açılıp kapanmasını düzenlemektedir (Bouck vd. 1996, Hicklin ve Ellis 2005, Ribatti 2009). Pro-anjiyojenik faktörlerin anti-anjiyojenik faktörlere göre daha fazla olması anjiyojenik anahtarı açarak yeni kılcal damarların oluşum süreci başlatılırken dengenin anti-anjiyojenik faktörler lehinde olması anjiyojenik anahtarı kapatarak yeni damarların biçimlenmesini engellemektedir (Bouck vd. 1996).

Tablo 1.1. *Anjiyojenezi tetikleyici faktörler ve fonksiyonları*

Tetikleyici Faktör	Fonksiyonu
Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ailesi üyeleri	Anjiyojenez ve vaskülojenezi teşvik eder, lökosit adezyonunu sağlar ve geçirgenliği arttırır
Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), Nöropilin-1 (NRP-1)	Anjiyojenik sinyaller ve hayatta kalma sinyalleriyle etkileşime girerler
Anjiyopoietin 1 (Ang1) ve Ang1 reseptörü (Tie2)	Geçirgenliği baskılamak ve damarları kararlı bir hale getirmede görev alırlar
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB) ve reseptörleri	Düz kas hücrelerini bir araya toparlarlar
Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β1), endoglin, TGF- β reseptörleri	Hücreler arası matriks üretimini uyarmada görev alırlar
Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Hepatosit büyüme faktörü (HGF), Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)	Anjiyojenezi ve arteriojenezi uyarmada görev alırlar
İntegrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ proteinler	Matriks makro molekülleri ve proteinazlar için reseptör görevi görürler
Vasküler endotelyal kaderin (VE kaderin), Trombosit endotel hücre adezyon molekülü (PECAM – CD31)	Endotel bağlanma molekülleri olarak görev alırlar
Efrinler	Arteryel / venöz özellikleri düzenlemede görev alırlar
Plazminojen etkinleştiriciler, Matriks metalloproteinazlar (MMPs)	Matriksi yeniden modeller, büyüme faktörlerini salınımı ve aktivasyonunda görev alırlar
Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1)	Gelişmekte olan damarları stabilize eder
Nitrik oksit sentaz (NOS), Siklooksijenaz-2 (COX-2)	Anjiyojenez ve vazodilatasyonu uyarır
Hematopoietik kök hücre markörü AC133	Anjioblast farklılaşmasını düzenlemektedir
Kemokinler	Anjiogenezde pleiotropik rol oynarlar
Heliks-sarmal-heliks transkripsiyon faktörleri Id1 ve Id3	Endotelyal plastisitenin belirlenmesinde rol alırlar

Kaynak: *Carmeliet ve Jain 2000, s. 254.*

Tablo 1.2. *Anjiyojenezi baskılayıcı faktörler ve fonksiyonları*

Baskılayıcı Faktör	Fonksiyonu
VEGFR-1, Çözünür VEGFR-1, Çözünür NRP-1	VEGF, VEGF-B ve Plasental büyüme faktörü (PIGF) için reseptör görevi üstlenirler
Ang2	Ang1 antagonisti
Trombospondin-1 (TSP-1), TSP-2	Endotel hücre göçünü, büyümesini, yapışmasını ve hayatta kalmasını baskılamada görev alırlar
Anjiyostatin ve ilgili plazminojen üzerindeki bazı özel bölgeler (kringle)	Tümör anjiyojenezini baskılar
Endostatin (kollajen XVIII parçaları)	Endotel hücrelerin hayatta kalmasını ve göçünü baskılar
Vasostatin, Kalretikülin	Endotel hücre büyümesini baskılar
Trombosit faktörü-4	bFGF (bazik fibroblast büyüme faktörü) ve VEGF'in bağlanmasını baskılar
Metaloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP), MMP baskılayıcılar, MMP-2'nin bir parçası olan PEX	Patolojik anjiyojenezi baskılarlar
Meth-1ve Meth-2 proteinleri	MMP, TSP ve disintegrin içeren alanların inhibitörleri olarak görev alırlar
İnterferon-α (INF-α), INF-β, INF-γ, INF-γ-kaynaklı protein-10 (IP-10), İnterlökin-4 (IL-4), IL-12, IL-18	Endotel hücre göçünü baskılarlar, bFGF'nin miktarının azalmasını düzenlerler
Protrombin kringle-2; Antitrombin III parçası	Endotelyal büyümeyi baskılarlar
Prolaktin (M_r, 16K)	bFGF/VEGF baskılayıcılar
Vasküler endotelyal büyüme inhibitörü (VEGI)	Hücre büyümesini düzenler
Asidik ve sistein amino asidince zengin salgılanan protein (SPARC) parçası	Endotelyal bağlanmayı ve VEGF'in aktivitesini baskılamaktadır
Osteopontin parçası	İntegrin sinyalizasyonuna müdahale etmek
Maspin	Proteaz inhibitörü
Kanstatin, proliferin ile ilgili protein, restin	Endotel hücre göçü ve çoğalmasını baskılarlar.

Kaynak: *Carmeliet ve Jain 2000, s. 254.*

1.3. Tümör Mikro Çevresi ve Anjiyojenez

Lösemi ve asit (ascites) tümörleri gibi bazı tümörler hücre süspansiyonu halinde gelişim gösterirken çoğu tümör katı (solid) doku kitleleri halinde büyümektedirler (Connolly vd. 2003). Solid tümör yapıları incelendiğinde; sağlıklı dokulara benzer bir şekilde, diğer dokulardan ayrı bir yapı sergiledikleri ve kendi içlerinde birbiriyle ilişkili, ancak kompartımanlar halinde ayrılmış olan; tümör hücrelerinden oluşan "*parankima*" isimli bir kısım ile bu tümör hücrelerinin kendi büyümeleri ve yayılmaları için pro-tümörijenik, immün-baskılayıcı ve çeşitli metabolitleri salgılamaları sonucunda modifiye edebildikleri, düzenleyebildikleri ve yönlendirebildikleri bir tür matriks olan "*stroma*" isimli kısım olmak üzere iki bölümden oluştukları gözlemlenmektedir (Dvorak vd. 1991, Contran vd. 1999, Connolly vd. 2003, Maes vd. 2016). Tüm tümör oluşumları besin desteği ve metabolik atıkların uzaklaştırılması amacıyla stromaya ihtiyaç duymaktadır; solid tümörler tümör tipine veya hücresel kökenlerine bağlı olmaksızın 1-2 mm çapa ulaştıkları zaman stromaya gereksinim duyarken, lösemi gibi süspansiyon halinde gelişen tümörlerde stromanın görevini kan plazması üstlenebilmektedir; ancak anjiyojenez gibi stroma içinde oluşması gereken cevaplar lösemi için kemik iliği gibi ilgili dokularda meydana gelebilmektedir (Folkman 1992, Aguayo vd. 2000, Dickson ve Sham 2001). Solid tümörlerde, konakçı dokunun sağlıklı hücreleri ile malignant hücreler arasında yer alan ve tümör hücrelerinin konakçı üzerinde oluşturduğu etkiler nedeniyle büyük ölçüde konakçının bir ürünü olarak oluşan stroma, inflamatuar (yangısal) hücreler, perisitler, bağ doku ve kan damarlarından oluşmaktadır (Nagy vd. 1995, Connolly vd. 2003, Maes vd. 2016). Solid tümörlerin stroması, inflamatuar hücrelerin akınını sınırlayabilirken tümör hücrelerinin dokudan çıkışını (invazyonunu) da engelleyebilmekte; dolayısıyla stroma tümör dokusunun beslenmesi ve büyümesi için gerekli bir dolgu materyali sağlarken; sıvıların, gazların ve hücrelerin tümör dokusuna geçişi için de bir bariyer veya düzenleyici görevi üstlenmektedir (Connolly vd. 2003). Tümör stromasının genel bileşimi yeni kan damarlarına ek olarak damarlardan sızmış olan plazma ve plazma proteinlerinden, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardan, interstisyel kollajenler, fibrin ve fibronektin proteinlerden, fibroblastlar, perisitler ve

inflamatuar hücreler gibi normal bağ dokusu hücrelerinden oluşmaktadır (Connolly vd. 2003, Billottet ve Jouanneau 2008).

Hücreler ile bu hücrelerin mikro çevreleri arasındaki iki yönlü iletişim tümör büyümesi ve normal doku gelişiminde olduğu kadar tümör anjiyojenezinin gerçekleşmesi için de büyük önem arz etmektedir (Quail ve Joyce 2013). Anjiyojenik anahtarın açılıp açılmayacağı da, hücre içi ve hücrelerin mikro çevrelerinde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak belirlenmektedir (Carmeliet ve Jain 2000, Ribatti 2009). Bir dokuya ulaşan kan damarlarındaki şekerin normal seviyelerden daha düşük miktarda olması (hipoglisemi), demir eksikliği (hipoferremia), oksijen yoğunluğunun yeterli seviyede olmaması (hipoksi) ve pH'ın metabolik aktiviteler sonucu biriken atıklar nedeniyle doku ve hücre içinde çok düşmesi gibi metabolik stres yaratan faktörlerin oluşması, normalden hızlı çoğalan tümör hücreleri nedeniyle mekanik baskının artması, bağışıklık sistemi ve inflamatuar tepkiler sonucu ilgili hücrelerin dokulara sızması, genetik mutasyonlar sonucu anjiyojenez ile ilgili yolakların veya faktörlerin yeniden düzenlenmesi gibi birçok değişim anjiyojenik anahtarın kaderini belirleyebilmektedir (Carmeliet 1999, Kerbel 2000).

Anjiyojenezi baskılayıcı ve tetikleyici faktörler arasındaki dengede meydana gelen bozulmalar sonucunda tümör dokularının etrafındaki damarlarda birçok yapısal ve fonksiyonel anormallikler gözlemlenebilmektedir (Wang vd. 2015). Anormal sızıntıların oluşması, potansiyel büyüme ve yeniden damar modellenmesinin gözlenmesi, yüksek kıvrımlı damar yapılarının veya çapları geniş, bazal laminası kesintili ve kapiller yapı içinde yer alan endotel hücrelerin arası mesafeli olan (sinüzoidal) damar yapılarının oluşması, damar çevrelerinin perisit ve düz kas hücreleri gibi damar destekleyici hücreler tarafından daha gevşek bir şekilde sarılması, arteryol ve venöz damar ayrımının net olarak yapılamaması, karışık bir kan akışının gözlenmesi, damarların düşük besleyici özelliğe ve fonksiyonel yetersizliğe sahip olması, endotel hücrelerden oluşan damar duvarına tümör hücrelerinin dahil olması veya tümör kök hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşarak tümör dokusu damarlarına dahil olması (vasküler taklit) gibi fonksiyonel ve yapısal anormallikler tümör dokularının damarlanması için birer işaret olarak kabul edilmekte, tümör hücrelerinin kan dolaşımına girmesini

sağlamakta ve tümör dokusunun mikro çevresinin patolojik özelliklerinin korunması sağlamaktadır (van der Schaft vd. 2004, Nagy vd. 2012, Xue vd. 2012, Hedlund vd. 2013, Hosaka vd. 2013). Ayrıca tümör dokusunda yer alan damarların heterojen bir yapı sergilediği, tümör dokusunun yayılım gösteren kenarlarında daha yoğun bir damarlanmanın olduğu, merkezinde yer alan damarların ise daha karmaşık bir yapı sergilediği bilinmektedir (Nagy ve Dvorak 2012).

Tümör dokusunda yer alan hücrelerin hızlı ve anormal bir şekilde çoğalması sağlıklı dokular üzerinde olduğu gibi damar yapıları üzerinde de mekanik bir stres oluşturmakta ve bazı bölgelerde anormal büyüklükte damarlar gözlemlenirken bazı bölgelerde ise gelişmemiş ve küçük damar yapıları gözlenebilmektedir (Jain 2005). Bu durumun bir sonucu olarak da anormal kan akışı, hipoksi, hipoglisemi, aşırı geçirgenlik (hiperpermeabilite) ve birçok solid (katı) tümörün iç basıncında artış gibi durumlar meydana gelebilmekte ve kanser tedavinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının da tümör dokusuna nüfuz etmesinde problemlerle karşılaşılabilmektedir (Wang vd. 2015).

Yukarıda da bahsedildiği üzere tümör dokusunda meydana gelen hipoksi durumunun; tümör proliferasyonu (çoğalması), tümör yayılımı (invazyon) ve metastaz ile bağlantılı olduğu gibi tümör anjiyojeneziyle de aralarında enteresan bir bağlantı bulunmaktadır (Carnero ve Lleonart 2015, Michiels vd. 2016, Paduch 2016). Büyümekte ve yayılmakta olan tümör dokusunu besleyen damarların yetersiz olmasının bir sonucu olarak hipoksi durumu oluşmakta ve tümör hücreleri hipoksiyle indüklenen transkripsiyon faktörlerin (HIF) aktivasyonu aracılığıyla bazı anjiyojenik sitokinler ile bazı büyüme faktörlerini salgılayarak anjiyojenezi tetikleyebilmektedir (Lee vd. 2015, Henze ve Mazzone 2016). Bununla birlikte, tümör anjiyojenezi sonrasında; mekanik stres, yeni oluşan kılcalların yapısal bozuklukları ve fonksiyonel işlevsizlikleri gibi nedenlerle, dokudaki hipoksi durumu daha fazla artış gösterebilmektedir (Wang vd. 2015). Bu kısır döngü nedeniyle de kanser olgusu daha agresif ve ağır bir şekilde ilerleyerek metastatik özellik kazanabilmektedir (Michiels vd. 2016). Ayrıca, tümör dokusunda gözlemlenebilen kaotik kan dolaşımı, damarlardaki yapısal ve fonksiyonel bozukluklar, tümör

dokusunun kanlanmasında (perfüzyonunda) düzensizliğe ve döngüsel hipoksi adı verilen farklı bir hipoksi türüne neden olabilmektedir (Dewhirst vd. 2008).

Akut hipoksi, dalgalı hipoksi veya aralıklı hipoksi olarak da bilinen döngüsel hipoksi olayı ilk kez Brown tarafından 1979 yılında, hipoksinin tümör dokularında gözlemlenen bir türevi olarak bilim dünyasına sunulmuştur (Brown 1979). Brown'un keşfinden sonra yapılan çalışmalarda ise döngüsel hipoksi durumunun tümör anjiyojenezini takip eden evrelerde meydana geldiği belirlenmiş ve tümör dokusunun, düzensiz perfüzyon nedeniyle, önce hipoksi durumuna maruz kaldığı, daha sonra ise yeniden oksijenlendiği (reoksijenasyon) ve bu kısır döngünün sürekli tekrar ettiği belirlenmiştir (Chaplin vd. 1986, Chaplin vd. 1987, Trotter vd. 1989a, Trotter vd. 1989b). Tümör anjiyojenezinden sonra oluşabilen döngüsel hipoksi durumunun, kronik hipoksi durumundan daha farklı etkilere yol açarak hücresel davranışlarda değişikliklere neden olabildiği, epigenetik ve supra-onkojenik süreçleri etkileyebildiği ve kanser hücrelerinin daha agresif, tedaviye dirençli ve metastatik karakterler sergilemesine öncülük edebildiği yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur (Chandel vd. 1998, Bristow ve Hill 2008, Boidot vd. 2014, Michiels vd. 2016, Rankin vd. 2016). Dolayısıyla döngüsel hipoksinin ya da döngüsel hipoksi durumunu oluşturan faktörlerin hedeflenmesi; tümör dokusunu oluşturan hücrelerin tedaviye karşı direnç oluşturmasını, metastatik özellik kazanmalarını veya agresif bir şekilde proliferasyon hızlarını arttırmalarını engellemek için büyük önem arz etmektedir (Wang vd. 2015, Michiels vd. 2016, Wigerup vd. 2016).

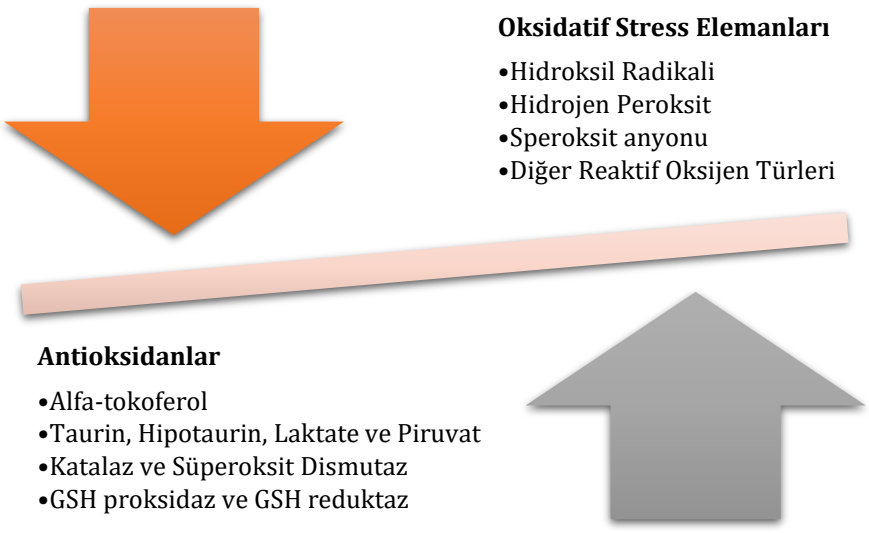
Anjiyojenez direk olarak tümör hücrelerinin malignant (habis) özellik kazanması üzerine etkili değilken tümör gelişimini ve metastazı direk olarak tetiklediği bilinmektedir (Carmeliet ve Jain 2000). Bununla birlikte, anjiyojenez sonrası gerçekleşen döngüsel hipoksi gibi durumların tümör hücrelerinin malignant özellik kazanması üzerine direk olarak etki ettiği de açıkça tespit edilmiştir (Choi vd. 2015, Sun ve Li 2015). Tümör hücreleri, döngüsel hipoksi nedeniyle mikro çevrelerinde gerçekleşen değişimlerden korunmak ve yaşamlarını sürdürebilmek amacıyla bazı korunma mekanizmalarını aktive ederek daha agresif ve malignant özellikler kazanabilmektedir (Sun ve Li 2015).

Döngüsel hipoksinin oksijen kıtlığı yaşanan hipoksi evresinde; oksijen kıtlığı nedeniyle ATP üretiminde problemlerle karşılaşılmakta ve protein sentezi gibi ATP tüketimi gerektiren bazı mekanizmalar baskılanabilmektedir (Michiels vd. 2016). Reoksijenasyon gerçekleştiğinde ise ATP üretimi gerçekleştirilerek ATP yoksunluğunda baskılanan bu mekanizmalar tekrar aktive edilmekte ve protein sentez süreçleri kaldıkları yerden devam etmektedir (Michiels vd. 2016). Moeller ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yayınlanan bir çalışmada, hipoksi durumunda ATP tüketimi gerektiren bir mekanizma olduğu için baskılanan; ancak hipoksi durumunda üretilmesi gereken transkripsiyon faktörlerden biri olan HIF-1 (hipoksiyle indüklenen transkripsiyon faktör-1) üretiminin, reoksijenasyon sonrasında hipoksi durumunun ortadan kalkmasına rağmen aktive olduğu bildirilmiştir (Moeller vd. 2004). Böylece paradoksal bir olgu meydana gelmiş ve hipoksiyle indüklenen transkripsiyon faktör-1 üretimi yanlış zamanda gerçekleştirilerek devreye girmemesi gereken sinyal mekanizmalarının devreye girmesi sağlanmıştır (Moeller vd. 2004, Michiels vd. 2016). Yanlış zamanlı işleyen bu mekanizmaların, kanser hücresi için bir dezavantaj oluşturması beklenirken avantaj oluşturması ve kanser hücrelerinin mikro çevrelerine adaptasyonlarında önemli bir olgu olarak karşımıza çıkması ise şaşırtıcıdır (Moeller vd. 2004, Toffoli ve Michiels 2008).

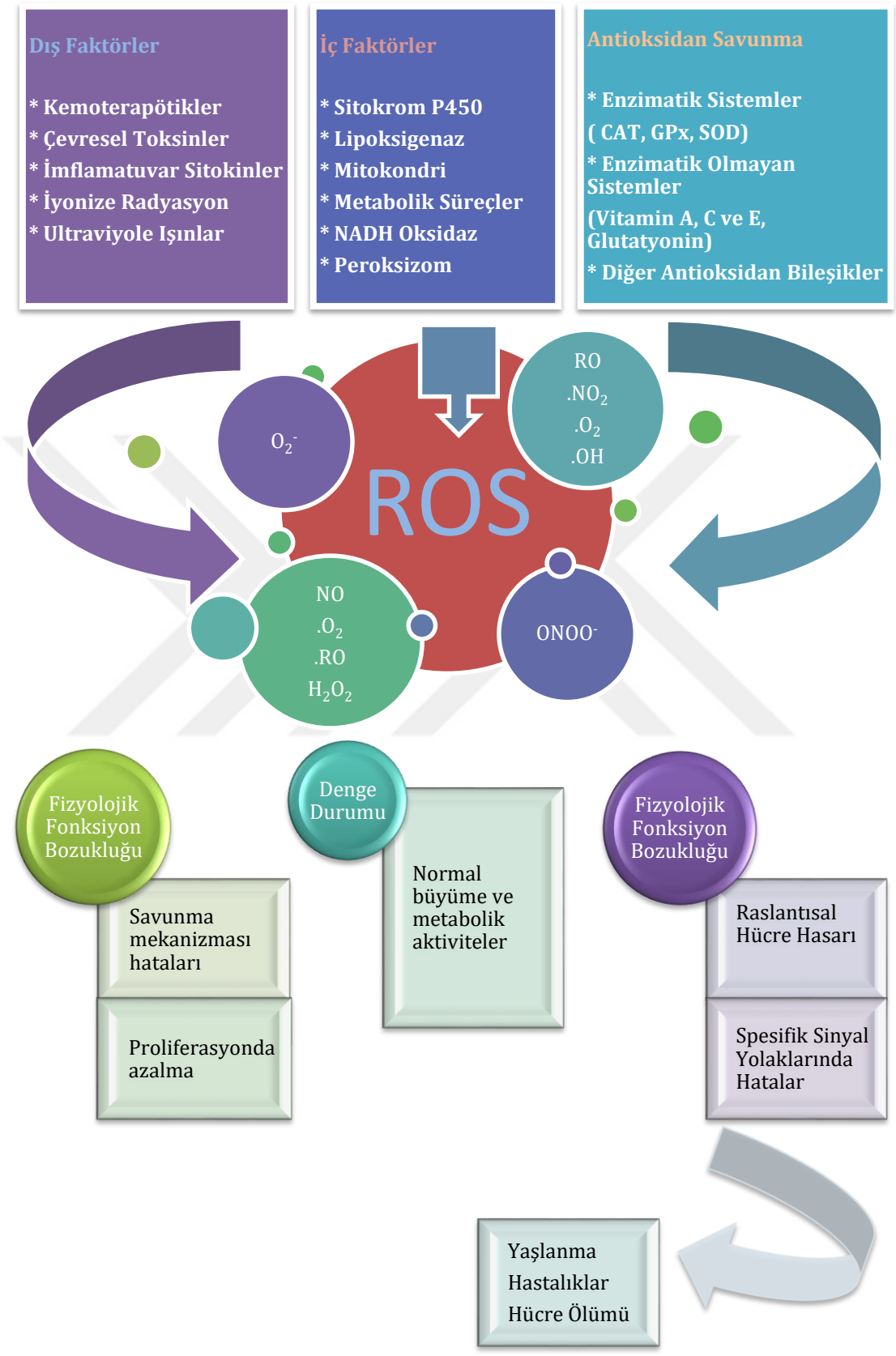
Protein sentezi gibi ATP gerektiren mekanizmaların ATP yoksunluğunda baskılanması işlemi ise stres granülleri adı verilen ribonükleoprotein komplekslerinin oluşturulması ile sağlanmaktadır (Anderson vd. 2015). Kanser hücrelerinin, mikro çevrelerinde meydana gelen değişimlere adaptasyon sağlamalarında, yüzlerce farklı molekül içerebilen bu stres granüllerinin büyük öneme sahip olduğu, kanser metabolizması ve gen ekspresyonunda görev aldığı tespit edilmiş; ancak hücre içi mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Anderson vd. 2015). Tümör anjiyojenezi sonrasında oluşan döngüsel hipoksi olgusu, kanser hücrelerinde hipoksik ve normoksik şoklara neden olabilecek yetenekteki mikro çevreyi oluşturmaktadır; ancak kanser hücreleri geliştirdikleri bu stres granülleri sayesinde değişen ortam koşullarına karşı adapte olabilmektedir (Moeller vd. 2004).

Yukarıda da bahsedildiği üzere hipoksi durumunun oluşması ile başlatılan HIF-1 üretim süreci ATP yoksunluğu nedeniyle sürdürülemeyerek baskılanmakta ve reoksijenasyon ile birlikte üretim sürecinin üzerinden baskı kalkarak süreç kaldığı yerden devam ettirilmektedir. Böylece bir sonraki hipoksi dönemine, kanser hücrelerinin hazırlıklı olarak girmesi sağlanmakta ve hipoksik şoka uğramaları engellenmektedir (Moeller vd. 2004, Toffoli ve Michiels 2008). Bunun bir sonucu olarak da; normal koşullarda bir dezavantaj olması gereken yanlış zamanlı sinyal oluşumu, kanser hücresinin yaşamını devam ettirmesinde bir avantaj haline dönüşmektedir.

Hipoksi durumunun neden olduğu bir diğer problem de, yüksek oksidatif stres sonucu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarında artış gözlemlenmesidir (Fulda vd. 2010). Sağlıklı bir mikro çevreye sahip olan sağlıklı bir hücre içinde üretilen ROS miktarı ile bu tür reaktif molekülleri etkisiz hale getiren antioksidan moleküllerin miktarı dengededir (Şekil 1.2) (Tsuda 2012). Ancak, sağlıklı hücrelerde gözlemlenen bu denge nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, kanser ve erken yaşlanma gibi olgular ile bazı dış faktörlerin etkisiyle bozulabilmektedir (Şekil 1.3) (Sena ve Chandel 2012, Varol 2013). Kanser hücrelerinin hızlı proliferasyonları sonucu oluşan mekanik stres, kan damarlarına olan mesafelerinin yüksek olması ve tümör anjiyojenezi sonrasında oluşan damarların yapısal ve fonksiyonel bozuklukları; hipoksi veya döngüsel hipoksi şartlarının oluşmasına öncülük etmektedirler (Michiels vd. 2016).



Şekil 1.2. *Reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar moleküller arasındaki denge*



Şekil 1.3. *Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve muhtemel hücresel cevaplar*

Kaynak: *Varol, 2013, s. 13*

Kronik hipokside ve döngüsel hipoksinin oksijen yoksunluğu yaşanan hipoksi evresinde oluşan stres sonucunda özellikle mitokondriyal metabolizma etkilenmekte ve ATP üretimi sekteye uğramaktadır (Waypa vd. 2016). Bunun bir sonucu olarak da, mitokondriyal membran potansiyelinde artış olduğu, elektron sızıntısının gerçekleştiği, ROS üretimin arttığı, protein, iyon ve küçük moleküllerin mitokondrinin iç membranından transportunun düzensizleştiği, 90'lı yıllarda yapılan birçok çalışma ile belirlenmiştir (Jung vd. 2010, Orr vd. 2015, Waypa vd. 2016). Chandel ve arkadaşları tarafından 1998 yılında yayınlanan ve mitokondriyal DNA'sı bulunmayan hücrelerin kullanımıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada da, hipoksi durumuna maruz kalan bu hücrelerde ROS üretiminde anlamlı bir artış olmadığı gösterilmiştir (Chandel vd. 1998). Kısaca, hipoksi durumunda meydana gelen ROS üretimindeki artışın temel sebebi mitokondriyal metabolizmanın bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır (Michiels vd. 2016). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise tıpkı ATP yoksunluğunda baskılanan mekanizmalarda olduğu gibi ROS üretiminde de, döngüsel hipokside gözlemlenen reoksijenasyon evresinde, hipoksi durumuna göre çok daha fazla bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Granger ve Kvietys 2015). Reoksijenasyon evresinde yaşanan oksijen bolluğu nedeniyle, ROS üretiminin hipoksi durumuna göre 100 kat daha fazla olduğu düşünülmektedir (Granger ve Kvietys 2015). Döngüsel hipoksi ile kronik hipoksinin hücreler üzerine oluşturdukları etkilerin birbirinden farklı olmasının nedenlerinden biri de üretilen ROS miktarlarındaki bu farklılığa dayandırılmaktadır (Michiels vd. 2016). Moeller ve arkadaşları, reoksijenasyon sonrasında artan ROS miktarına bağlı olarak HIF-1'in aktive olduğunu, Hammond ve arkadaşları ise artan ROS miktarı nedeniyle DNA hasarında artış olduğunu tespit etmişlerdir (Hammond vd. 2003, Moeller vd. 2004). Ayrıca, ilginç bir şekilde, tek döngülü bir model olarak uygulanan döngüsel hipoksi modeliyle gerçekleştirilen çalışmalarda, endotel hücrelerinde hipoksi evresinde ROS üretiminde artış gözlemlenmezken, reoksijenasyon evresi sonrasında ciddi bir ROS artışı olduğu belirlenmiştir (Toffoli vd. 2009, Hsieh vd. 2010). Döngüsel hipoksi kaynaklı ROS üretiminin etkilerinin incelendiği bazı *in vivo* modellerde ise kronik hipoksi oluşturulan tümörlere ve hipoksik koşullara maruz kalmamış olan kontrol tümörlerine göre lipit peroksidasyonu gibi oksidatif stres ürünlerinde ve 8-oxoguanine gibi oksidatif DNA

hasarlarında daha fazla artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Kalliomäki vd. 2008, Hsieh vd. 2010).

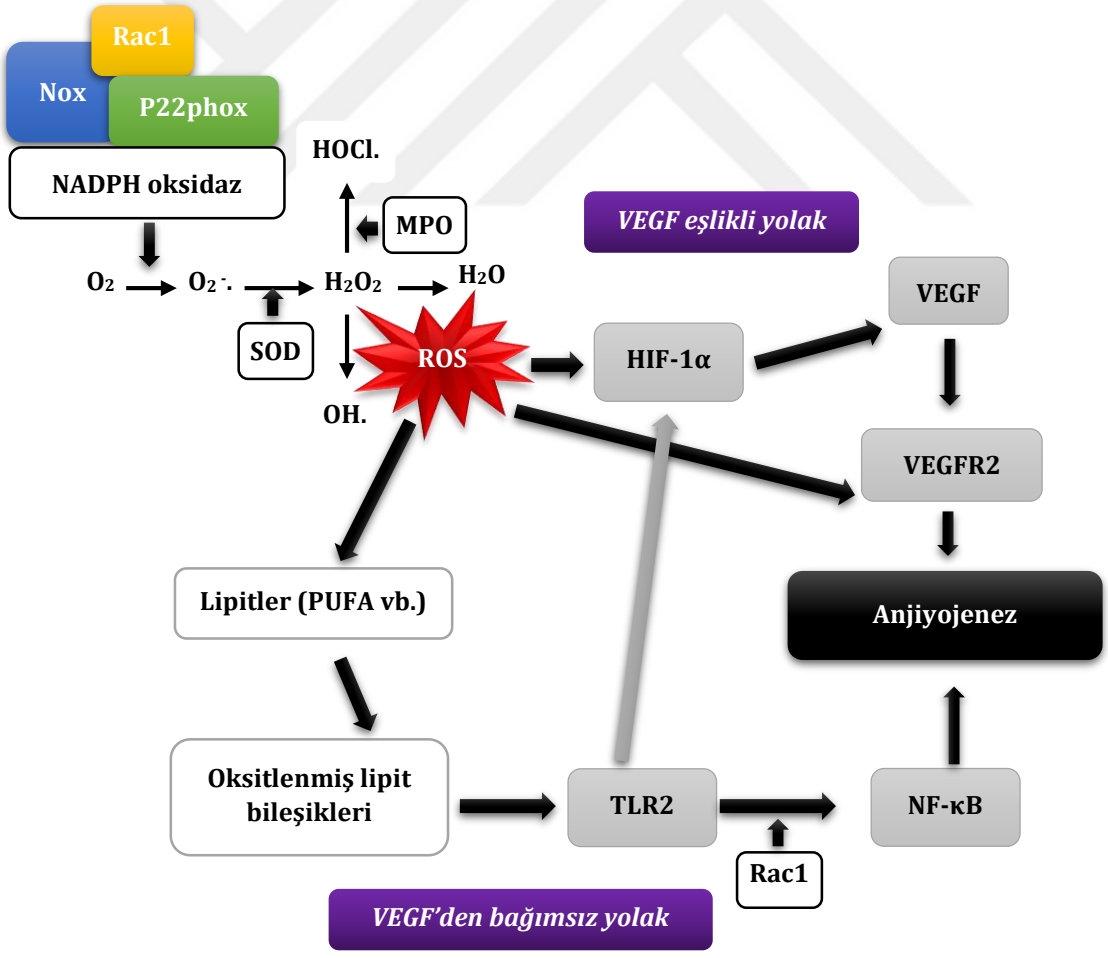
Reoksijenasyon sırasında, oksijenin akut olarak aniden artış göstermesi ROS üretiminde gerçekleşen ani patlamanın sebebi olarak kabul edilmekte ve üretilen bu ROS'un dihidronikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazlar (NOX), ksantinoksidaz, sitokrom P450 enzimleri ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri gibi çeşitli kaynaklardan köken aldığı bilinmektedir (Koritzinsky ve Wouters 2013, Michiels vd. 2016). Bununla birlikte, üretilen reaktif oksijen türlerinin asıl ana kaynaklarının NOX türevleri ve mitokondri organeli olduğu düşüncesi yaygındır (Glasauer ve Chandel 2014). Hsieh ve arkadaşları, glioblastoma hücrelerini kullanarak *in vitro* şartlarda gerçekleştirdikleri bir çalışmada, döngüsel hipoksi koşullarına maruz bırakılan hücrelerde arttığı tespit edilen hücre içi ROS miktarının, NADPH oksidaz alt birim 4'ün (NOX-4) ekspresyonunda meydana gelen artışa bağlı olarak gerçekleştiğini göstermişlerdir (Hsieh vd. 2010). Daha sonra, yine glioblastoma hücrelerini kullanarak gerçekleştirdikleri *in vivo* bir çalışmada da NOX-4 ve döngüsel hipoksi şartlarında meydana gelen ROS üretimindeki artış arasındaki bağlantıyı NOX-4'ü baskılayarak ortaya koymaya çalışmışlar ve NOX-4'ün baskılanması nedeniyle döngüsel hipoksi şartlarında ROS üretiminde artış olmadığını belirlemişlerdir (Hsieh vd. 2012). Bununla birlikte, döngüsel hipoksi şartlarında meydana gelen ROS üretimindeki artışın ana sebeplerinden birinin de mitokondri kökenli elektron sızıntılarının olduğu unutulmamalıdır (Koritzinsky ve Wouters 2013).

Kanser hücreleri, kendilerini etkileyen diğer birçok olumsuz hücre içi ve hücreler arası koşullara adaptasyon sağlayabildikleri gibi döngüsel hipoksi sonucu hücre içinde meydana gelen aşırı ROS üretimine karşı da çeşitli korunma mekanizmalarını devreye sokabilmektedirler (Azad vd. 2009). Bilindiği üzere hücre içinde, çeşitli sebeplerle, normalden fazla üretilen ROS nedeniyle, hücre içinde görevli lipit, protein ve DNA gibi birçok molekül ve çeşitli hücre organellerinde oksidatif hasar meydana gelebilmekte ve hücre bütünlüğü bozulabilmektedir (Blokhina vd. 2003). Bazı durumlarda, sağlıklı hücrelerde de fazlaca üretilen ROS nedeniyle bazı hücre içi hasarlar meydana gelebilmekte ve hücreler oluşan bu

hasarlara karşı; antioksidanların üretimini arttırarak, bazı özel proteinlerin ortadan kaldırılması için ubikuitin-proteazom sistemini devreye sokarak veya hasarlı protein ve organellerin otofaji yoluyla ortadan kaldırılmasını sağlayarak bir cevap oluşturabilmektedirler (Grune vd. 2003, Kiffin vd. 2006, West ve Sweeney 2012). Hücre içinde artan ROS miktarı nedeniyle hasara uğrayan bileşenlere karşı oluşturulan cevaplardan biri olan otofaji; bir hücrenin sitoplazmasında bulunan bileşenlerin lizozom organeli aracılığıyla parçalanarak geri dönüştürülmesi olayını tanımlayan genel bir terim olarak karşımıza çıkmaktadır (Klionsky ve Emr 2000, Ohsumi 2001). Hücre farklılaşması ve gelişim sırasında önemli bir role sahip olan otofaji; amino asit yoksunluğunda devreye girmekte ve hücre içinde bir nevi geri dönüşüm aracı olarak görev üstlenmektedir (Scherz-Shouval ve Elazar 2007). Döngüsel hipoksi durumunda artan ROS miktarı nedeniyle oluşan hücre hasarlarına karşı otofajinin bir korunma mekanizması olarak kullanılması ise ilginç bir olgu olarak karşımıza çıkmakta ve kanser hücrelerinin orantısız olarak oluşan oksidatif stres nedeniyle yok olmalarının önünde bir engel oluşturmaktadır (Scherz-Shouval ve Elazar 2007, Scherz-Shouval ve Elazar 2011, Li vd. 2015, Michiels vd. 2016). Rouschop ve arkadaşları tarafından *in vitro* şartlarda gerçekleştirilen bir çalışmada, otofaji olayı klorokin isimli bir madde ile engellenmiş ve döngüsel hipoksi sırasında artan ROS nedeniyle gerçekleşen hücre ölümlerinde artış olduğu belirlenmiştir (Rouschop vd. 2009). Doku perfüzyonundaki aksaklıklar nedeniyle oluşabilen amino asit yoksunluğuna bağlı olarak aktive olabilen ve hücre içinde bir tür molekül geri dönüştürme aracı olarak görev alabilen otofaji mekanizmasının, yine benzer sebeplerle oluşan oksijen yoksunluğuna bağlı olarak artan ROS üretiminden kaynaklanabilecek hücre ölümlerini engelleyici bir mekanizma olması, ilginç ve paradoksal bir olgu olarak karşımıza çıkmakta ve kanser hücrelerinin mikro çevrelerine adapte olarak yaşamlarına devam etmelerini sağlamaktadır (Scherz-Shouval ve Elazar 2007, Rouschop vd. 2009, Koritzinsky ve Wouters 2013).

Tümör dokusunda gözlemlenen önemli bir mikro çevre değişimi olan döngüsel hipoksi olgusunun meydana geliş mekanizmalarında da bahsedildiği üzere; tümör mikro çevresinde ve tümör hücreleri içinde oluşan stres ortamları nedeniyle anjiyojenik faktörlerin üretilmesi ve hücreler arası matrikse salgılanmasıyla tümör anjiyojenezi tetiklenmektedir. Bunun bir sonucu olarak oluşan yeni kılcal

damarların yapısal ve fonksiyonel olarak düzensiz olmaları, doku içindeki kaotik bir kan dolaşımı olması ve düzensiz perfüzyon gibi olgular nedeniyle; tümör hücrelerinin mikro çevresinde ve hücrelerin içinde daha karmaşık ve ağır stres durumu oluşmaktadır (Wang vd. 2015, Michiels vd. 2016). Bilindiği gibi kronik hipoksi durumunda üretilen ROS miktarı, tümör anjiyojenezi sonrasında üretilen ROS miktarına göre daha azdır (Hsieh vd. 2012). Tümör anjiyojenezi sonrasında oluşan koşullar nedeniyle üretim miktarında artış gözlemlenen reaktif oksijen türlerinin (ROS) aynı zamanda tümör anjiyojenezini tetikleyebilme özelliğindedirler (Ushio-Fukai vd. 2002, Wang vd. 2011). Tıpkı hipoksi koşulları sonrasında tetiklenen tümör anjiyojenezinin daha zararlı özelliklere sahip döngüsel hipoksi olgusuna neden olması ve döngüsel hipoksinin de tekrar tümör anjiyojenezini tetikleyebilmesi gibi paradoksal bir durumun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. (Şekil 1.4) (Chua vd. 1998, Bir vd. 2012, Kim ve Byzova 2014).



Şekil 1.4. *Reaktif oksijen türlerinin (ROS), VEGF eşlikli ve VEGF'den bağımsız olarak, anjiyojenezi etkileme mekanizmaları*

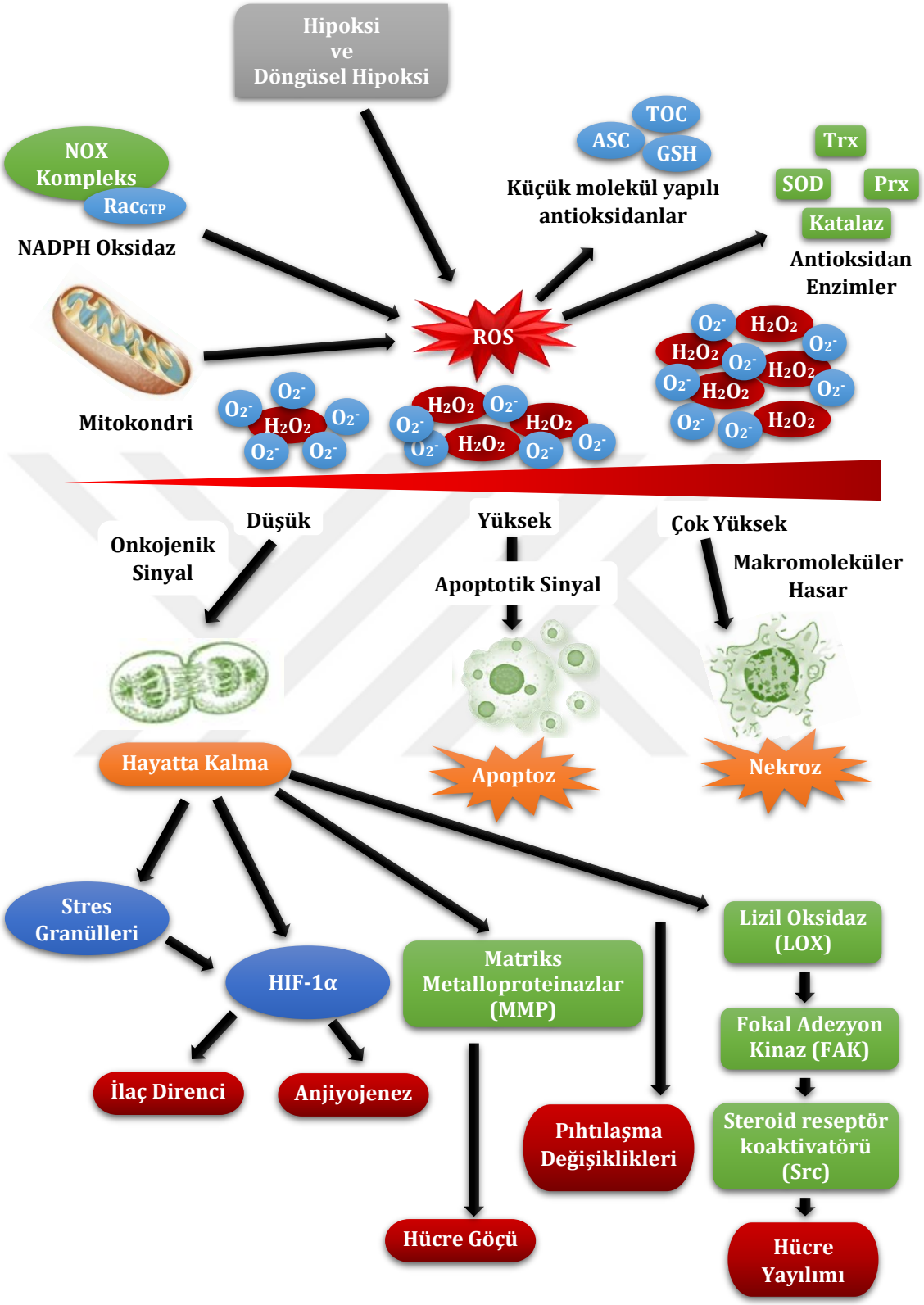
Bilindiği üzere hücre içinde biriken reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynağı; Rac1, Nox1, Nox2, insan nötrofil sitokrom b hafif zinciri (p22phil veya CYBA) gibi dihidronikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazlar (NOX) ve mitokondri organelidir (Koritzinsky ve Wouters 2013, Kim ve Byzova 2014, Michiels vd. 2016). Bu kaynaklardan köken alan süperoksit anyonları genellikle kendiliğinden veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri aracılığıyla hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşebilirler (Turrens 2003, Fukai ve Ushio-Fukai 2011). Bu dönüşüm sonrasında ise nötrofil tarafından salgılanan miyeloperoksidaz (MPO); hidrojen peroksit ve klorürü yüksek reaktif özelliğe sahip olan hipoklorit moleküllerine dönüştürebilmektedir (Kim ve Byzova 2014). ROS miktarında meydana gelen olağan dışı artışların meydana getirdiği temel problemlerden biri de; protein ve lipitlerin peroksidasyonu (yükseltgenmesi) sonucu, bu moleküllerin hücre içinde üstlendikleri asli işlevlerini yitirmeleridir (Guéraud vd. 2010, Negre-Salvayre vd. 2010). Hücre içinde meydana gelen lipit peroksidasyonu; diğer lipit moleküllerine göre oksidasyon eğilimi daha fazla olan ve yeni reaktif bileşikler oluşturabilme kapasitesine sahip olan, fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) kısmı da dahil olmak üzere, hücre zarı lipitlerini etkilemektedir (Guéraud vd. 2010). Yükseltgenen bu moleküller ise reaktif oksijen türevlerinden daha fazla tehlikeli olabilen oksitlenmiş ikincil bileşiklerin oluşumunda etkili olabilmektedir (Negre-Salvayre vd. 2010). ROS miktarındaki artış nedeniyle oksitlenmiş lipitler, hücre içinde Toll benzeri reseptör 2 (TLR2) aracılığıyla hipoksiyle indüklenen transkripsiyon faktör-1-alfanın (HIF-1α) ekspresyon seviyesini etkileyebilmekte ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) eşlikli yolak üzerinden anjiyojenezi tetikleyebilmektedir (Spirig vd. 2010). Ayrıca, TLR2'nin VEGF'den bağımsız olarak nükleer faktör κB'yi (NF-κB) aktive ederek de anjiyojenezi tetikleyebildiği bilinmektedir (Şekil 1.4) (Mutoh ve Ueda 2013).

ROS üretim evreleri içinde süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit moleküllerinin üretimi vasküler hücreler için özel bir öneme sahip gibi görünmektedir; çünkü yeni damarların oluşturulması ve büyümesi ya da vasküler işlevsizliğe ve yıkıma yol açmak için çeşitli yolları aktive edebilirler (Bir vd. 2012). Hidrojen peroksit molekülünün endotel hücreleri üzerine etkisinin incelendiği bir dizi çalışmada, bu molekülün konsantrasyona bağlı olarak endotel hücre hasarına

neden olduğu tespit edilmiştir (Shimizu vd. 1994, Yasuda vd. 1998). Yüksek konsantrasyonlarda (>125 μM) endotel hücre hasarını tetikleyerek letal (öldürücü) etki gösteren hidrojen peroksit molekülünün; 0,1-10 μM aralığındaki düşük konsantrasyonlarının ise sığır torakal (karın boşluğu ve göğüs boşluğunu birbirinden ayıran diyaframa kadar olan kısım) aortasından izole edilmiş endotel hücrelerinin tüp formu oluşturmalarını tetiklediği belirlenmiştir (Burdon vd. 1990, Kim ve Byzova 2014). Bu nedenle; bilim adamları tarafından, tümör hücreleri tarafından yüksek miktarda üretilen hidrojen peroksit molekülü ile tümör anjiyojenezinin tetiklendiği düşüncesi ortaya atılmıştır (Szatrowski ve Nathan 1991, Yasuda vd. 1998, Kim ve Byzova 2014). Bilindiği üzere, döngüsel hipoksi olgusunda hipoksi evresini takip eden reoksijenasyon ile ortamda çok miktarda reaktif oksijen türevleri ve dolayısıyla hidrojen peroksit molekülü oluşmaktadır (Li vd. 2015, Michiels vd. 2016). Yapılan bazı çalışmalarda da hidrojen peroksit molekülünün endotel hücrelerin tüp formu oluşumunu tetiklemesini destekler niteliktedir (Fukuda vd. 2001). Döngüsel hipoksinin insan kılcal damar endotel hücrelerinde tübüler morfogenezi (boru şeklinde özel bir şekil kazanma) hızlandırdığı ve kronik miyokart enfarktüsü (kalp kasının bir bölümünün yetersiz perfüzyon nedeniyle ölmesi) olgusuna sahip hayvan modellerinde miyokart anjiyojenezini tetiklediği belirlenmiştir (Fukuda vd. 2001, Sasaki vd. 2002). İnsan göbek bağı damar endotel hücreleriyle (HUVEC) yapılan bir çalışmada ise leptin molekülünün hücre içine ROS alımını arttırdığı ve böylece anjiyojenezde artış gözlemlendiği belirlenmiştir (Yamagishi vd. 2003). Hücre içindeki ROS miktarında ve ROS üretiminde azalmaya neden olan NOX baskılayıcılar ve antioksidan moleküllerin miktarındaki artışında anjiyojenezi baskıladığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Kim ve Byzova 2014). Difeniliyodonyum ve aposinin gibi NOX baskılayıcıların; *N*-asetilsistein, SOD, peroksiredoksinler (PRX), tiyoredoksinler (TRX), mannitol ve katalaz gibi serbest radikal ve ROS süpürücülerin, askorbat (ASC), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve tokoferoller (TOC) gibi küçük molekül yapılı antioksidanların anjiyojenezi baskıladığı belirlenmiştir (Koch vd. 1992, Cai vd. 1999, Al-Shabrawey vd. 2005, Krishna vd. 2011). Ayrıca, adenovirüs etkisiyle fazlaca üretilen hücre dışı (ekstrasellüler) SOD'un da tümör anjiyojenezini ve melanomanın gelişimini durdurduğu bilinmektedir (Wheeler vd. 2003). ROS üretiminin anjiyojenez üzerine

etkili olduğunu gösteren genetik çalışmalarda ise katalaz geninin nakavt edilmesiyle Angiopoietin-1 (ANG-1) tarafından tetiklenen vasküler yeniden modellenmenin kontrol gruplarına göre daha belirgin olduğu belirlenmiştir (Kim vd. 2006b, Garrido-Urbani vd. 2011). Nox1 ve Nox2 genlerinin nakavt edilmesiyle de endotel hücre göçünde, tüp benzeri yapı formalarının oluşumunda, VEGF eşlikli anjiyojenezde ve yeni damar oluşumda (neovaskülarizasyon) gerileme ise önemli ölçüde problemler oluştuğu belirlenmiştir (Ushio-Fukai vd. 2002, Tojo vd. 2005, Chen vd. 2006, Kim vd. 2006b, Garrido-Urbani vd. 2011). Binker ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yayınlanan bir çalışmada, ROS üretiminin matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) salgılanmasını arttırdığı ve pankreas kanseri hücrelerinin yayılımını bu yolla tetiklediği gösterilmiştir (Binker vd. 2010). Postovit ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise lizil oksidazın (LOX) döngüsel hipoksi sonrası gözlemlenen hücre göçünde görev aldığı belirlenmiş ve yayılım özelliği olmayan meme kanseri hücrelerinde, döngüsel hipoksiye bağlı LOX bağımlı FAK/Src aktivasyonu yoluyla hücrelerin göç etme eğilimde artış oluştuğu gösterilmiştir (Postovit vd. 2008).

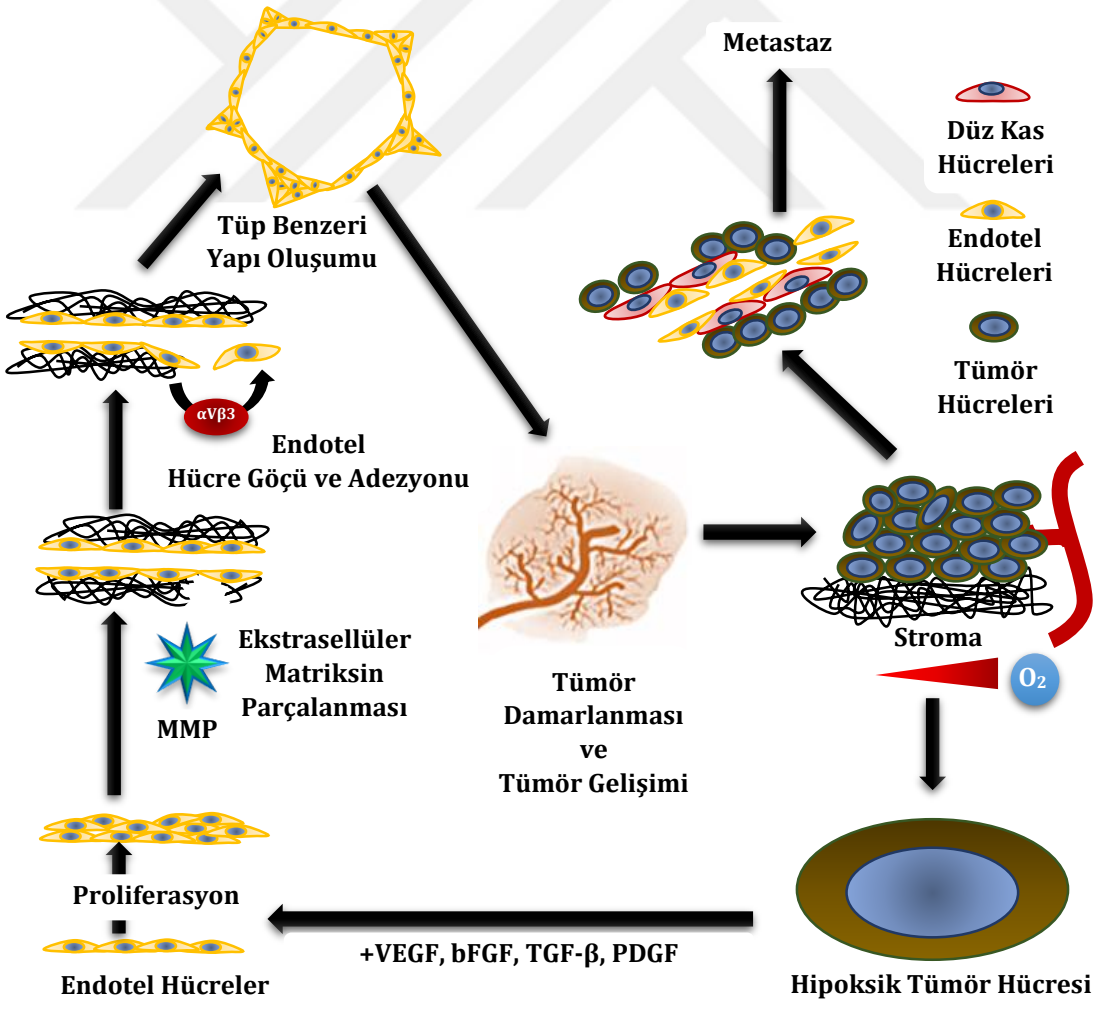
Sonuç olarak tümör mikro çevresinde, tümör anjiyojenezi öncesinde oluşan kronik hipoksi ve tümör anjiyojenezi sonrasında gözlemlenebilen döngüsel hipoksi olgularında oluşturulan reaktif oksijen türlerinin miktarı farklı olduğu için tümör anjiyojenezi üzerine gösterebilecekleri etkiler de farklı olabildiği bilinmektedir (Kim ve Byzova 2014, Michiels vd. 2016). Sağlıklı dokularda uygun miktarlarda ve kısıtlı bir süre için geçici olarak üretilen ROS bileşiklerin, dokulara ulaşan damarların homeostatik bakımları ve fizyolojik anjiyojenez için temel gereksinimlerden biri olduğu aşikardır (Yasuda vd. 1998, Kim ve Byzova 2014). Süreklilik arz eden bir ROS üretiminin ve üretilen bu bileşiklerin hücre içinde birikiminin, hücre ve doku için hasar oluşturucu ve ölümcül bir sona neden olacağı da açıktır (Krishna vd. 2011). Bu nedenle; kanser ve bazı kronik hastalıklar için hücre içinde üretilen ve biriken reaktif oksijen türleri, iki ucu keskin bir kılıç gibi hücrelerin hayatta kalması için bir adaptasyon veya hücreleri ölüme götüren bir sonun başlangıç aşaması olarak kabul edilmektedir (Şekil 1.5). Ancak oksidatif stres kaynaklı anjiyojenez ile ilgili hücre içindeki çok yönlü sinyal yolakları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Krishna vd. 2011, Kim ve Byzova 2014, Sun ve Li 2015).



Şekil 1.5. *Reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre kaderi üzerine aktiviteleri*

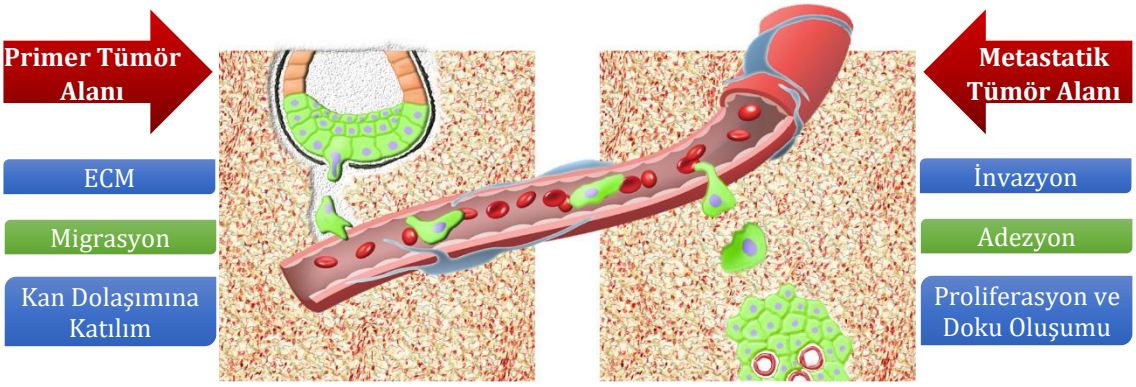
1.4. Tümör Anjiyojenezi ve Metastaz

Tümör hücrelerinin mikro çevreleriyle iki yönlü bir etkileşim içinde oldukları ve bu etkileşimin bir sonucu olarak da tümör anjiyojenezinin gerçekleştiği bilinmektedir (Michiels vd. 2016). Tümör anjiyojenezinin ise mikro çevrede değişimlere neden olarak; tümör hücrelerinin çoğalması, büyümesi, gelişmesi ve daha agresif özellikler kazanarak malignant karakter sergilemesine yol açtığı bilim çevrelerince kabul görmektedir (Wang vd. 2011, Kim ve Byzova 2014). Anjiyojenezin; ekstrasellüler matriks (ECM) parçalanması, endotel hücre göçü, adezyonu ve proliferasyonu, endotel hücrelerin tüp benzeri yapıları oluşturmaları ve yeni kılcal damarların şekillenmesi gibi çok sayıda süreci içeren kompleks bir olay olarak meydana geldiği bilinmektedir (Şekil 1.6) (Carmeliet ve Jain 2000, Rundhaug 2005, Pipinikas vd. 2008, Betz vd. 2016).

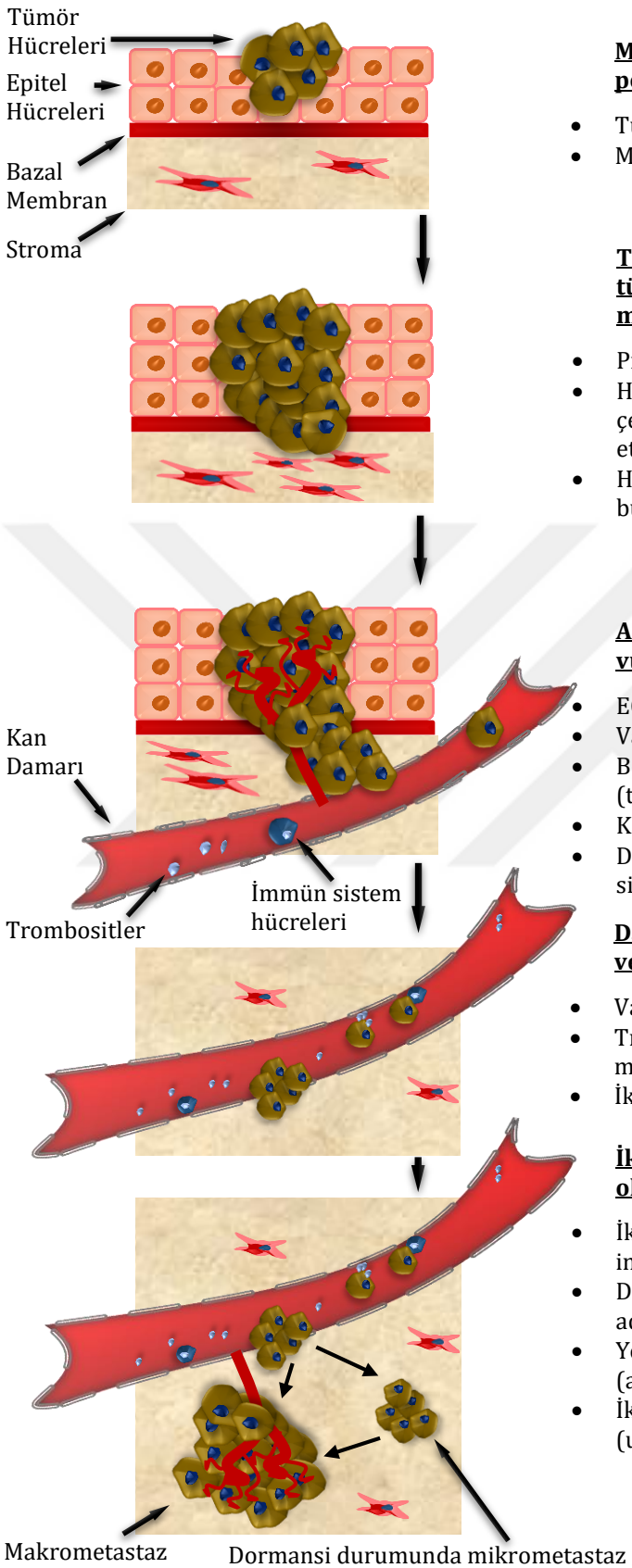


Şekil 1.6. *Hipoksi nedeniyle tetiklenen tümör anjiyojenezi ve metastaz süreçleri*

Tümör anjiyojenezi sonucu mikro çevrede meydana gelen değişimler de dahil olmak üzere genetik ve epigenetik değişimleri içeren kompleks olaylar zinciri sonucunda hücreler malignant özellik kazanabilmektedir (Michiels vd. 2016). Malignant hücreler ise kontrol edilemeyen büyüme ve çoğalma potansiyelleri, etraftaki dokuları istila etme (invazyon) ve metastaz yapabilme becerileriyle diğer hücrelerden kolayca ayırt edilebilirler (Hanahan ve Weinberg 2000, Hanahan ve Weinberg 2011). Kanser hücreleri oluşum mekanizmaları nedeniyle bir dereceye kadar malignant özelliğe sahip olsalar dahi, invazyon ve metastaz gibi malignant yeteneklerin gelişmesinde, bu yeteneklerin derecelerinde ve faaliyete geçme zamanlamalarında; tümör dokusunu oluşturan hücrelerin genetik ve epigenetik olarak heterojen bir dağılım göstermeleri ve mikro çevrede meydana gelen değişimler ile bu çevredeki hücreler arası sinyallerin farklılığı gibi ekstrinsik (dışsal) faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Gupta ve Massagué 2006). Kanser hastalıklarının erken tanı ve teşhisi önemli olmasına karşın çoğu kanser vakasında hastalığın teşhis edilmesi ve tedaviye başlanmasına kadar geçen süre içinde mikro (geleneksel yöntemlerle tespit edilemeyecek büyüklükte) veya makro düzeyde metastaz gerçekleştiği bilinmektedir (Morgan vd. 2009, Talmadge ve Fidler 2010). Kanser gelişiminin erken veya geç evrede bulunmasına bağlı olmaksızın metastaz gözlemlenebilmekte ve primer (birincil) tümörün metastaz ile yayılımı nedeniyle solid yapılı tümörlere sahip olan hastaların %90'ı yaşama veda etmektedir (Sporn 1996, Hanahan ve Weinberg 2000, Talmadge ve Fidler 2010, Hanahan ve Weinberg 2011). Metastazın gerçekleşebilmesi için de tıpkı tümör anjiyojenezinde olduğu gibi ekstrasellüler matriks (ECM) parçalanması, tümör hücresinin invazyonu, göçü, adezyonu ve proliferasyonunu içeren bazı kompleks süreçlerin gerçekleşmesi gerekmektedir (Şekil 1.7 ve Şekil 1.8) (Jiang vd. 2015).



Şekil 1.7. *Tümör hücrelerinin metastazı ve metastatik doku oluşum süreci*



<u>Malignant doku gelişimi ve invazyon potansiyeli kazanımı</u>

- Tümör metastatik genler
- Metastatik süpresör (baskılayıcı) genler

<u>Tümör büyümesi, çoğalması ve tümörü çevreleyen dokunun bazal membranına invazyonu</u>

- Proteaz aktivitesinde artış (MMP'ler)
- Hücre hareketliliğinde ve ECM, tümörü çevreleyen doku ve stromal hücrelerle etkileşimde artış
- Hücre-hücre etkileşiminin bütünlüğünde ve kuvvetinde azalma

<u>Anjiyojenez, damar içi dolaşım ve vücudun farklı bölgelerine taşınım</u>

- ECM ile etkileşim ve içinde hücre göçü
- Vasküler hücrelerle etkileşim
- Boşluk mezotel hücreleri ile etkileşim (transkoelomik metastaz sırasında)
- Kan damarına invazyon
- Dolaşımda hayatta kalma ve bağışıklık sisteminden kaçınma

<u>Damar dışına sızma (ekstravazasyon) ve ikincil bölgede tutunma</u>

- Vasküler hücrelerle etkileşim
- Transkoelomik metastaz sırasında mezotel hücreleriyle etkileşim
- İkincil dokuya invazyon

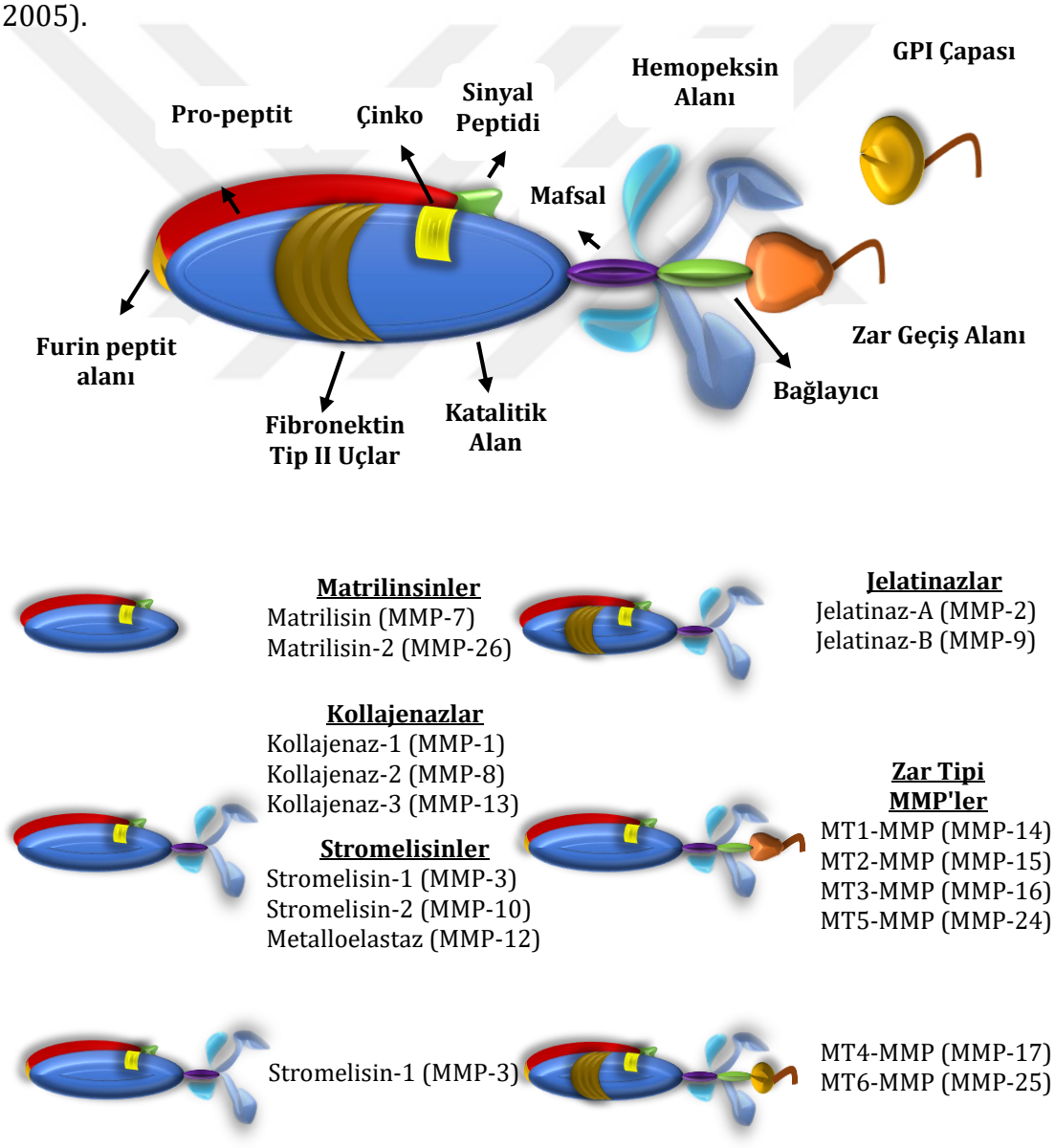
<u>İkincil dokuya invazyon ve metastaz oluşumu (makro veya mikro)</u>

- İkincil doku içinde hücre göçü ve invazyon
- Doku mikro çevresiyle etkileşim ve adaptasyon
- Yeni damarların oluşturulması (anjiyojenez)
- İkincil tümör oluşumu veya dormansi (uyku) haline geçiş

Şekil 1.8. *Tümör dokusunun gelişimi, makrometastaz ve mikrometastaz süreçleri*

1.4.1. Matriks metalloproteinazlar ve ekstrasellüler matriksin parçalanması

Matriksinler olarak da isimlendirilen matriks metalloproteinazlar (MMP); ekstrasellüler matriksin (ECM) içinde bulunan çeşitli bileşenleri parçalayabilme yeteneğinde olan, aktivite gösterebilmeleri için işlenmeleri gereken pro-enzim (öncül enzim) veya latent enzim (şartlara bağlı faaliyet gösterebilen enzim) olarak üretilen ve çinko metali içeren, 20'den fazla endopeptidazdan oluşan bir protein ailesini ifade etmektedirler (Nagase ve Woessner 1999). Matriksinler, sahip oldukları kimyasal yapılarına ve/veya tepkimelerinde işlenen maddelerine (substratlarına) göre en az 5 farklı gruba ayrılabilmektedirler (Şekil 1.9) (Rundhaug 2005).



Şekil 1.9. *Matriks metalloproteinaz enzimlerinin genel yapısı ve tipleri. GPI: glikosilfosfatidilinositol.*

Matrilisinler; sahip oldukları bir sinyal peptit, bir pro-peptit alanı ve çinko içerikli katalitik bir bölge ile matriks metalloproteinazların en basit yapıya sahip olan alt sınıfı olarak karşımıza çıkmaktadır (McCawley ve Matrisian 2001, Lynch ve Matrisian 2002, Rundhaug 2005). Tip I, II, III ve diğer fibriler kollajenlerin doğal sarmal yapısını parçalayan kollajenazlar ise matrilisinlerden farklı olarak, katalitik alana prolin amino asitince zengin bir mafsal aracılığıyla bağlanmış basit bir hemopeksin benzeri alan içermektedir (McCawley ve Matrisian 2001, Lee ve Murphy 2004). Kollajenazlara benzer bir yapıya sahip olduğu gözlemlenen stromelisinlerin, geniş bir substrat özgüllüğüne sahip oldukları ve proteoglikan, fibronektin ve laminin gibi birçok ekstrasellüler matriks proteinini parçaladıkları bilinmektedir (McCawley ve Matrisian 2001, Stamenkovic 2003). Genellikle jelatin proteinlerinin parçalanmasında aktivite gösteren jelatinaz tipindeki MMP'lerin ise katalitik bölgelerinin üzerinde üç kez tekrar eden tip II fibronektin alanları mevcuttur ve bu enzimler doğal kollajenlerin (tip IV, V, VII ve X), fibronektin ve laminin proteinlerinin parçalanmasında da görev alabilirler (McCawley ve Matrisian 2001, Lee ve Murphy 2004). MMP'lerin bir diğer alt sınıfı olan zar tipi MMP'ler (MT-MMP) ise bir C-terminal zar geçiş alanı veya glikosilfosfatidilinositol çapası (GPI çapası) vasıtasıyla hücre yüzeyine bağlanırlar ve jelatin, fibronektin ve agrekan gibi ECM substratlarının parçalanmasında görev alabilirler (McCawley ve Matrisian 2001, Lynch ve Matrisian 2002, Vihinen ve Kähäri 2002, Lee ve Murphy 2004, Rundhaug 2005).

Normal fizyolojik şartlar altında gerçekleşen bir anjiyojenez olgusunda (fizyolojik anjiyojenez); anjiyojenik sinyaller, matriks metalloproteinaz sinyalleri ve aktivitesi, hücre içi anjiyojenez baskılayıcılar ve matriks metalloproteinaz baskılayıcıları arasında bir denge mekanizması mevcuttur (Rundhaug 2005). Bu mekanizma hücre içi ve hücreler arası haberleşme mekanizmalarıyla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir; ancak bu kontrol mekanizması kanser gibi patolojik olgularda bozulmaktadır (Rundhaug 2005). Tümör anjiyojenezinin ve metastazın gerçekleşme aşamalarından bir bölümü matriks metalloproteinazların aktiviteleri sonucu ekstrasellüler matriksin parçalanması sayesinde meydana gelmekte ve bu enzimlerin aktivitelerinin tümör anjiyojenezi ve metastaz için kilit bir role sahip olduğu geniş bilim çevrelerince kabul görmektedir (Folkman 1971, Folkman 1992,

Klagsbrun ve Moses 1999, Carmeliet ve Jain 2000, Rundhaug 2005, Pipinikas vd. 2008, Jiang vd. 2015, Betz vd. 2016).

Bilindiği üzere, tümör gelişiminin erken aşamalarında anjiyojenezin tetiklenmesi ve ilerleyen evrelerinde metastazı destekleyen vasküler ağların korunmasında doğrudan veya dolaylı olarak görev alan çok sayıda molekül, moleküler yolak ve sistemler yapılan bilimsel çalışmalarla gün yüzüne çıkarılmıştır (Chung ve Ferrara 2011, Goel ve Mercurio 2013). Ancak; vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A veya VEGF); endotel hücre proliferasyonu ve bu hücrelerin bir araya getirilmesi, endotel hücre göçü ve tüp benzeri yapıların formasyonu, lümen oluşumu, damar genişlemesi ve geçirgenliği, vasküler ağların mikro mimarisi ve modellemesi de dahil olmak üzere tümör kaynaklı anjiyojenezin pratik olarak tüm yönlerini düzenleyen kritik bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Ferrara vd. 2003, Ellis ve Hicklin 2008, Welti vd. 2013, Deryugina ve Quigley 2015). Kanser hücrelerinin aktiviteleri sonucunda aktive olmuş fibroblastlar, alternatif yollarla aktive edilmiş olan dendritik hücreler ve nötrofiller, makrofajlar ve T lenfositler gibi doku içine sızmış lökositler de dahil olmak üzere farklı tipteki stromal hücrelerin tümör mikro ortamında VEGF kaynağı olabildiği bilinmekle birlikte anjiyojenezi tetikleyici VEGF'in doğrudan ve dolaylı ana kaynağının tümör hücreleri olduğu görülmektedir (Ito vd. 2007, Hawinkels vd. 2008, Coffelt vd. 2010, De Francesco vd. 2013,). Bununla birlikte, VEGF yolağı ile MMP yolakları arasında bir etkileşim olduğu ve transkripsiyon düzeyinde düzenlenmelerinin ortak bir şekilde ilerlediği belirlenmiştir (Deryugina ve Quigley 2015). Örnek olarak hipoksi durumunda sentezlenen HIF-1, hem VEGF'in hem de MMP-9'un ekspresyonunu aynı anda tetiklemektedir (Hoeben vd. 2004, Kudo vd. 2012). Ayrıca, VEGF protein sentezi ile MMP-2 ve MMP-9 matriks metalloproteinaz enzimlerin ekspresyonu arasında bir korelasyon olduğu ve bu proteinlerin tamamının mide kanseri vakalarında anjiyojenez ve metastaz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Zheng vd. 2006). MMP-9 matriks metalloproteinazın ise tümör matriksinin mimarisinin düzenlenmesinde görev aldığı ve vasküler büyüme faktörü (VEGF) ile bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi matriksde biriken büyüme faktörlerinin serbest bırakılmasında etkili olduğu bilinmektedir (Owen vd. 2003, Ardi vd. 2007). Kanser hücreleri tarafından salgılanan VEGF ve MMP'ler arasında bir

korelasyon bulunmasının yanında, kanser hücreleri tarafından salgılanan MMP-13'ün (kollajenaz-3); fibroblast ve endotel hücrelerinin VEGF salgılamasını tetiklediği ve böylece tümör anjiyojenezini oluşturduğu da belirlenmiştir (Kudo vd. 2012). Böylece, matriks metalloproteinazların sadece ekstrasellüler matriks veya tümör stromasının parçalanmasında görevli olmadığı, aynı zamanda VEGF sentezi içinde bir tetikleyici rolü üstlendiği belirlenmiştir; ancak MMP'lerin tümör anjiyojenezi ve metastazda üstlendikleri görevler hakkında yapılan çalışmaların henüz yeterli seviyede olmadığı düşünülmektedir (Deryugina ve Quigley 2015).

1.4.2. Hücre göçü (migrasyon)

Bilindiği üzere; tümör anjiyojenezi, metastaz ve vasküler taklit olgularının gerçekleşmesi için tümör hücrelerinin veya endotel hücrelerin göç etmeleri (migrasyonu) ve damar oluşturacakları veya doku oluşturacakları bölgeye ulaşmaları gerekmektedir (Pipinikas vd. 2008, Betz vd. 2016, Zhang vd. 2016). Anjiyojenezin gerçekleşmesi için gerekli temel mekanizmalardan biri olan endotel hücre migrasyonu; farklı damarlarda belirli bir şekilde etkili olabilen çok sayıda sinyal yolağıyla tetiklenmekte ve bir seçici mekanizma oluşmaktadır ki bu mekanizmanın farklı kan damarlarının aynı anda oluşumunu koordine etmek için önemli olduğu düşünülmektedir (Wiley vd. 2011, Vanhollebeke vd. 2015, Betz vd. 2016, Ulrich vd. 2016).

Anjiyojenez sırasında gerçekleşen endotel hücre migrasyonunda; kimyasal çekenlere (kemoatraktan) yönelim şeklinde gerçekleşen kemotaksis, immobilize edilmiş (hareketsiz bırakılmış) ligandlara yönelim şeklinde gerçekleşen haptotaksis ve mekanik etkiler sonucu yönelim şeklinde gerçekleşen mekanotaksis olmak üzere 3 temel mekanizma olduğu bilinmektedir (Li vd. 2005, Lamalice vd. 2007). Kemotaksis olayı genellikle bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerine doğru endotel hücrelerin migrasyonu şeklinde gerçekleşirken, haptotaksis olayı ekstrasellüler matriks bileşenlerine bağlanmış integrin proteinlerine karşı endotel hücrelerinin göç ederek oluşturdukları bir cevap şeklinde gerçekleşmektedir (Klemke vd. 1997, Giroux vd. 1999, Lamalice vd. 2007 Bach 2015). Kan damarlarında gözlemlenen

akışkan soyma stresinin (shear stress: apikal (serbest) hücre yüzeyinde endotel hücrelerin kan akışı yönünde deforme olması) mekanotaksisi başlattığına, endotel hücrelerin kenarlarında uzantıların oluşmasına neden olduğuna, matrikse adezyonu azalttığına ve hücrenin arka yüzeydeki matrikse bağlanma noktalarının serbest bırakılmasına dair, hücre göçünün çeşitli adımlarını düzenlediğini gösteren kanıtlar mevcuttur (Şekil 1.6) (Li vd. 2005). Bu kapsamda, endotel hücre migrasyonunun; hücre adezyonu, sinyal iletimi ve hücre iskeleti değişimi gibi moleküler süreçlerin organizasyonunu ve dinamiklerini koordine eden mekanik bir olay olduğu düşünülmektedir (Lamalice vd. 2007, Betz vd. 2016).

Yukarıda da bahsedildiği üzere, endotel hücreleri çeşitli mekanik ve kimyasal faktörlerin etkisi altında dışa doğru bir filiz oluşturacak şekilde uzayabilmekte ve uzayan bu hücreler "*tip (uç) hücresi*" adını almakta, tip hücresinin altında kalan hücreler, "*sap ya da stalk hücreleri*", ise çoğalarak bu filizin gelişmesini ve tüp formu kazanmasını sağlamaktadır (Norton ve Popel 2016). Örnek olarak, tümör anjiyojenezinde; tümör hücreleri tarafından mikro çevrelerinde meydana gelen değişimlere adaptasyon ve yaşamlarını devam ettirebilmek amacıyla üretilerek stroma ortamında salgılanan ve MMP'lerin aktivitesi ile serbest kalan VEGF sinyal proteinleri endotel hücreleri uyararak tip hücrelerine dönüşmelerini ve sap hücrelerinin de çoğalarak tip hücrelerini desteklemelerini sağlamaktadır (Chung vd. 2010). Tip hücrelerinde üretilen ve sap hücrelerinin Notch (çentik) reseptörlere bağlanan delta benzeri ligand-4 (DLL) isimli sinyal protein sayesinde sap hücrelerinin tip hücrelerine dönüşümü engellenmekte ve bir bölgeden yalnızca bir tane kılcal filizin oluşması sağlanmakta, Notch sinyal reseptörünün kapatılması durumunda ise uygun aralıklara sahip olmayan çok sayıda kılcal damar filizi ve dallanma olduğu gözlemlenmektedir (Chung vd. 2010, Blanco ve Gerhardt 2013, Norton ve Popel 2016). VEGF ailesi elamanlarının ve reseptörlerinin yanında, 6 gruptan ve 23 farklı proteinden oluşan fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi elamanlarının da erken anjiyojenik faktörler olarak görev üstlendikleri ve endotel hücrelerinin çoğalması, migrasyonu ve farklılaşmaları üzerine etkili oldukları bilinmektedir (Yadav vd. 2015). Bununla birlikte, bFGF tarafından tetiklenen endotel hücre migrasyonunun; matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) olan TIMP-1 ve TIMP-2 tarafından baskılandığı tespit edilmiş olması ilginç

bir olgu olarak karşımıza çıkmaktadır; çünkü matriks metalloproteinazların aktivitesi sonucu ekstrasellüler matriks içinde gömülü olan bFGF'ler serbest kalabilmekte ve anjiyojenezde tetikleyici görevi üstlenebilmektedir (Murphy vd. 1993, Yadav vd. 2015).

Hücre göçü; tıpkı tümör anjiyojenezinde olduğu gibi tümör metastazında da önemli basamaklardan birini teşkil etmektedir (Condeelis ve Segall 2003, Jiang vd. 2015). Bununla birlikte, tümör hücrelerinin migrasyonu ile invazyon olgusunu birbirinden ayrı düşünmek doğru değildir; çünkü göç eden tümör hücreleri aynı zamanda çevrelerindeki dokuların içine doğru yayılım gösterirler (Fidler 2003).

1.4.3. Tümör hücresi yayılımı (invazyon)

Tümör hücrelerinin mikro çevrelerinde meydana gelen değişimler ve bu değişikliklere bağlı olarak uyarılan sinyal yolakları sayesinde tümör hücrelerinde hücre iskeleti dinamikleri değişmekte ve hücre-matriks ile hücre-hücre bağlantılarının bozulması sonucunda bu hücreler çevre dokular içine kendi yapı ve morfolojilerini de değiştirerek invaze olabilmektedirler (Şekil 1.7) (Chambers vd. 2002, Fidler 2003, Sahai 2007, Friedl ve Alexander 2011). İnvazyon sonrası tümör hücreleri; bazal membranlara ve endotel hücrelerin duvarlarına nüfuz ederek çevrelerinde bulunan damar ve lenf sistemleri içine sızmakta, dolaşıma karışmakta ve birincil tümör dokusundan uzak bölgelerde bulunan doku ve organların içine taşınarak koloni oluşturabilmekteler (Şekil 1.8) (Fidler 2003). Birincil tümör bölgesinde bulunan hücreler gibi metastatik alanda bulunan kanser hücreleri de kontrolsüz olarak çoğalırlar, invazyon özelliği sergilerler, dolaşım sistemi içine göç edebilirler ve ikincil bir metastazı gerçekleştirebilirler (Kienast vd. 2010, Armstrong vd. 2011, Hou vd. 2011). Hücre migrasyonundan farklı olarak tümör hücresi invazyonu heterojen bir şekilde mikro çevreye adaptasyon sağlanarak sürdürülmektedir (Friedl ve Alexander 2011). Tümör hücresinin invazyonundaki bu esneklik; hücre adezyonunda, hücre iskeleti dinamiklerinde, mekanik sinyal iletiminde meydana gelebilecek yapısal ve moleküler aksamalar ile olumsuz mikro çevre koşullarında dahi tümör hücrelerinin invazyonunun devam etmesini sağlayabilmektedir (Honeth vd. 2008, Stoecklein vd. 2008, Lopes vd. 2009, Wang vd.

2009, Choi vd. 2011, Shapiro vd. 2011). Bununla birlikte, tümör hücresinin proliferasyonu ve migrasyonunda olduğu gibi invazyonunda da birçok sinyal yolağı tetikleyici veya baskılayıcı olarak aktivite gösterebilmektedir. Örnek olarak, kanser hücrelerindeki onkojenlerin aktivasyonu sonrasında aktive olan; transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü-β (TGF-β), İnterlökin-10 (IL-10), IL-6, VEGF, C-C motifi kemokin ligandı-2 (CCL2)/ monosit kemoatraktan protein 1 (MCP 1) ve siklooksigenaz-2 (COX-2) gibi immün sistemi baskılayıcı moleküllerin kanser hücreleri veya çevresindeki hücreler tarafından üretilmesi; kanser hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonunda olduğu gibi invazyonunda da arttırıcı özellik kazanmasını sağlarlar (Jiang vd. 2015). Bununla birlikte, birincil tümör alanında bulunan stromal hücreler tarafından sunulan bFGF, TGF-β, HGF (hepatosit büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü) ve Wnt proteinlerinin de tümör hücrelerinin hayatta kalması, proliferasyonu, invazyonu ve metastaz üzerine etkili olduğu da unutulmamalıdır (Kim vd. 2006a, Jiang vd. 2015).

Tümör hücreleri mikro çevrelerinde meydana gelen değişimlere bağlı olarak tek tek invaze olabildikleri gibi kolektif olarak da invaze olabilirler ve bu kolektif invazyonda; hücre-hücre adezyonu, hücreler arası koordinasyon ile toplu migrasyonun eşgüdümlü gerçekleşmesi gerekmektedir (Friedl vd. 1995, Ilina ve Friedl 2009, Friedl ve Alexander 2011). Toplu invazyon da tıpkı tümör hücrelerinin tek tek invazyonunda olduğu gibi; hücre tipine, birlikte hareket eden hücrelerin sayısına ve işgal edilen doku yapısına bağlı olarak farklı morfolojiler sergileyebilir. Örneğin, kolektif olarak invaze olan hücrelerin oluşturduğu gruplar içinde endotel hücreleri bulunabilir ve lümen oluşturabilirler, bu gruplar küçük kümeler, katı boncuk dizileri veya ip şeklinde dizilmiş hücre sıraları şeklinde morfolojilere sahip olabilirler (Friedl ve Gilmour 2009). Toplu invazyonların birçoğunda ise bir veya birkaç tümör hücresi mezenkimal karakter sergileyerek lider konumuna gelir, böylece ip şeklinde sıralanmış hücre dizisinin ucunu oluşturur ve arkasındaki hücreleri de peşi sıra çekerek hedef dokunun içine doğru invaze olurlar (Gaggioli vd. 2007, Khalil ve Friedl 2010). Genellikle yumuşak doku içine doğru gerçekleşen, diğer bir toplu invazyon tipi ise invaze olacak hücreler tomurcuk şeklinde doku içine doğru ilerler, topluluk içinde belirgin bir lideri yoktur, bu nedenle de invazyonun yönü zaman zaman değişebilmektedir (Ewald vd. 2008). Tümör hücrelerinin tek tek

invazyonunda hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonunun bozulması önemli iken toplu invazyonlarda hücre-hücre adezyonunun korunmasının bütünlüğün bozulmaması için büyük öneme sahip olduğu görülmektedir (Friedl ve Alexander 2011).

1.4.4. Hücre adezyonu

Bahsedildiği üzere tümör anjiyojenezi, tümör invazyonu ve metastaz olgularında hücre-hücre adezyonu ve hücre-matriks adezyonunda meydana gelen değişimler; tüm bu süreçlerin gerçekleşebilmesi için önemli aşamalardan birini teşkil etmektedir (Folkman 1971, Folkman 1992, Klagsbrun ve Moses 1999, Carmeliet ve Jain 2000, Rundhaug 2005, Pipinikas vd. 2008, Betz vd. 2016). Hücrelerin birbirine adezyonu ve matriks ile etkileşimi; bu hücrelerin yüzeylerinde bulunan çeşitli yapıların yardımıyla gerçekleşmekte ve bu etkileşimler sayesinde hücreler birbirlerinden haberdar da olabilmektedir (Aplin vd. 1998, Junqueira ve Carneiro 2009). Hücre adezyon yapıları incelendiğinde ise bu yapıların kaderinler, integrinler, selektinler ve immünoglobulin süper ailesinden oluştuğu gözlemlenmektedir (Osborn 1990, Dicle 2004). Tümör hücrelerinin metastaz yapabilmesi için ilk önce hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarının gevşemesi ve invaze olacak hücre veya hücre gruplarının etrafındaki hücrelerden ve matriksden bağımsız hale gelmesi gerekmektedir (Friedl ve Alexander 2011). Adezyon, çoğunlukla farklı integrinlere bağlanma potansiyelinde olan ve immünoglobulin ailesine dahil olan endotelyal adezyon moleküllerince düzenlenmektedir (Pignatelli ve Vessey 1994, Koukoulis vd. 1998). Tümör nekroz faktör (TNF) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler tarafından salgılanması uyarılabilen hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) bu adezyon molekülleri arasında yer almakta ve bu moleküllerden ICAM-1; LFA-1 (CD11a/18) ve Mac-1 (CD11b/CD18) integrin reseptörüne bağlanabilirken, VCAM-1'in integrin reseptörü VLA-4' tür (Sheen-Chen vd. 1996).

Adezyon molekülleri arasında en iyi çalışılmış olanları, transmembran heterodimerik yapıya sahip olan ve hücrelerin migrasyonunda da görev alan integrinlerdir (Hynes 2002, Parsons vd. 2010). İntegrinler; fibronektin, kollajen ve

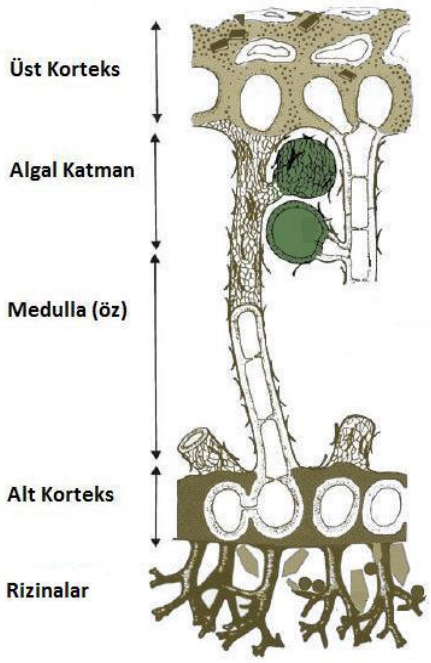
diğer bazı ekstrasellüler matriks proteinlerinin oluşturdukları özel motif sekanslarına tutunurlar ve bu tutunma sırasında integrinlerin moleküler yapısında meydana gelen konformasyon (3 boyutlu yapı) değişikliği nedeniyle, integrinlerin sitoplazma içinde bulunan kısa kuyruklarının, çoklu protein kompleksleri aracılığıyla, aktin hücre iskeleti elamanlarıyla etkileşiminde farklılaşma meydana gelir (Hynes 2002, Puklin-Faucher ve Sheetz 2009, Vicente-Manzanares vd. 2009). İntegrinler ve hücre iskeleti elamanı olan aktinler arasındaki çoklu protein bağlantıları; talin isimli bir proteinin baş bölgesinden integrinlere, kuyruk ve gövde bölgesinden de vinkulin proteinine bağlanmasıyla, vinkulin proteinlerin ise baş bölgesinden talinlere kuyruk bölgelerinden ise aktin hücre iskeleti elamanlarına bağlanmasıyla gerçekleşmektedir (Otey ve Carpen 2004, Ziegler vd. 2006). Adezom (adhesome) olarak da adlandırılan bu kompleks yapı uzun yıllardır aydınlatılmaya çalışılmakta ve 180 kadar protein-protein etkileşiminin olduğu, karmaşıklık ve etkileşimce zengin bir ağ olarak tanımlanmaktadır (Zaidel-Bar vd. 2007, Zaidel-Bar ve Geiger 2010). Örnek olarak verilen hücre adezyon moleküllerinden sadece bir tanesi olan integrinlerin; tümör anjiyojenezi, tümör metastazı ve invazyon gibi süreçlerin temel mekanizması olan migrasyon üzerine etki gösterebilmesi için dahi çok sayıda, karmaşık ve proteinlerce zengin bir ağ yapısının kurulması gerekmektedir (Parsons vd. 2010). Bu nedenle de, kanser gelişimi ve yayılımına yönelik gerçekleştirilen yeni ilaç ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi aşamalarında; hem tümör anjiyojenezi hem de tümör metastazı ve invazyonu hedeflenirken hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonu üzerine etkilerin de ikincil bir hedef olarak göz önünde bulundurulması büyük önem arz etmektedir.

1.5. Küçük Molekül Yapılı Doğal Bileşik Kaynakları Olarak Likenler

Geleneksel bir tedavi yöntemi olarak, sistemik kanser kemoterapisi hala birçok kanser olgusuna karşı majör tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (Gustavsson vd. 2015). Kemoterapi uygulayan doktorlar; mümkün olan en fazla sayıda kanser hücresinin yok edilmesini amaçlayarak maksimum klinik faydayı elde etmek istemekte, bu nedenle de hastalara tolere edebilecekleri maksimum miktardaki ilaç konsantrasyonunu vermektedir (Norton ve Simon 1986, Frei vd. 1998, Seidman 2005). Ancak, bu tarz bir yaklaşım; sistemik toksisite, ilaca karşı

kanser hücrelerinin direnç kazanması, uzun bir sürece yayılan farklı yan etkiler gibi bazı problemlere yol açmaktadır (Dy ve Adjei 2013, Varol 2016c). Bununla birlikte, doğal kaynaklar ve bunlardan elde edilen özüt (ekstrakt), kür, şurup, merhem, infüzyon (çay) ve bileşiklerin kullanımı Antik Çağlara dayanmaktadır ki Orta Doğuda bulunan bir mağarada 60.000 yıl öncesine ait tıbbi bitkilerin kullanımına dair kanıtlar 1960 yılında tespit edilmiştir (Solecki 1975, Saad vd. 2005, Ehrenreich 2010, Ghorbani 2014). Bu nedenle, kanser hastaları ve doktorlar; hastalar arasındaki ölüm oranının yüksek olması ve radyoterapi ile kemoterapinin yan etkilerini de göz önünde bulundurarak, konvansiyonel tıbbın yerine veya destekleyici olarak doğal kaynakların kullanımıyla gerçekleştirilen alternatif tedavi yöntemlerine yönelmektedir (Shapiro ve Recht 2001, Sharma ve Gupta 2015, V Simoben vd. 2015). Ayrıca, günümüzde klinik uygulamalarda faydalanılan modern farmosötik ilaçların %50'si bitkilerden türetilmekte ve kuvvetli anti-kanser aktiviteler göstermektedir (Rosangkima ve Prasad 2004, Ovadje vd. 2015).

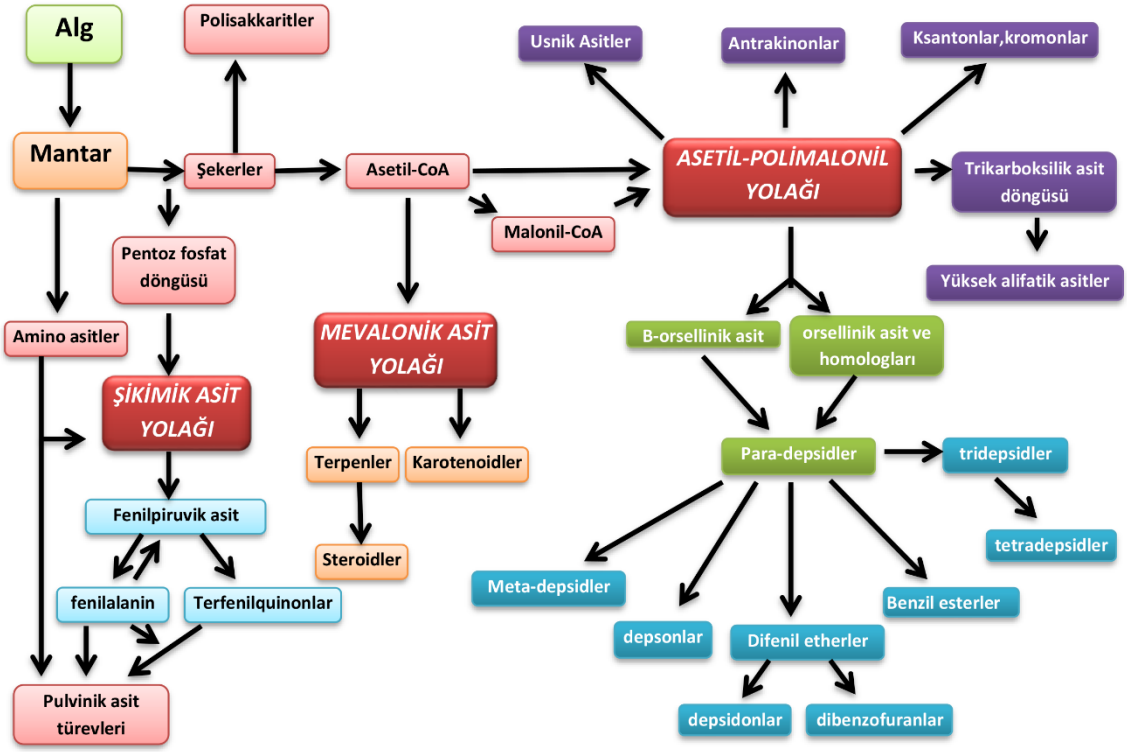
Doğal bileşik kaynakları içinde, liken olarak isimlendirilen organizmalar; sahip oldukları özel bileşikler ve bu bileşiklerin sergiledikleri biyolojik farmakolojik aktiviteler nedeniyle araştırmacıların dikkatini cezbetmekte ve doğal bileşik kaynağı olarak büyük önem taşımaktadırlar (Varol 2013, Varol 2015). Likenler; çok kuru, çok soğuk, bol güneşli veya sıcak ortamlar gibi birçok canlı için ekstrem olan koşullarında dahil olduğu birçok ortamda yaşamlarını sürdürebilmektedir (Purvis ve Pawlik-Skowrońska 2008, Valarmathi vd. 2009, Halıcı vd. 2010). Likenler, genellikle, toprak, ağaç kabukları ve kaya yüzeyleri üzerinde yayılış gösteren; karasal yaşama uyum sağlamış organizmalar içinde en erken kolonileşebilmiş ve simbiyotik bir yaşam şeklini benimsemiş olan; yeryüzünün yaklaşık %8 kadarını örtebilecek bir yaygınlığa sahip olmasına rağmen nispeten yavaş üreyen küçük boyutlu organizmalar olarak tanınmaktadır (Chen vd. 2000, Cocchietto vd. 2002, Nybakken vd. 2010). Ayrıca, likenler; mikobiyont (fungus) ve fotobiyont (alg ve/veya siyanobakteri) adı verilen ortakların oluşturduğu (Şekil 1.10); karbon(C), azot (N), fosfor (P) gibi elementler ile minerallerin döngüsü ve ekoloji denge için büyük önem arz ettiği düşünülen; yaklaşık 18.500 farklı türe sahip özel organizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır (Boustie ve Grube 2005, Dobson 2005, Valencia-Islas vd. 2007, Chooi vd. 2008, Varol 2013).



Şekil 1.10. *Bir liken yapısın diyagram olarak gösterimi*

Kaynak: *Varol, 2013, s. 3*

Likenleri oluşturan simbiyotik ortaklardan fotobiyont organizmalar bu ortaklık için fotosentez yaparak besin kaynağı olarak görev alırken, mikobiyont ortaklarda mineral, su ve karbon kaynağının sağlanmasında görev alır ve fotobiyont ortak için güvenli ve nemli bir ortamı temin ederler (Varol 2013). Likenler; bu karmaşık simbiyotik yapıları ve ekstrem koşullara olan adaptasyonları sayesinde, düşük molekül ağırlığına sahip olan ve bu nedenle küçük molekül yapılı doğal bileşikler olarak değerlendirilen, asidik yapıları nedeniyle ise liken asitleri olarak isimlendirilen bileşikler sentezleyebilmektedirler (Stocker-Wörgötter 2008, Molnár ve Farkas 2010, Sivas 2015, Varol 2015). Çoğunlukla sadece likenlere özgü olan bu bileşikler; mevalonik asit yolağı, şikimik asit yolağı ve asetil-polimalonil yolağı olmak üzere 3 temel sentez yolağı kullanılarak sentezlenen; depside, depsidon, dibenzofuran, pulvinik asit, antrakinon, ksanton ve şikimik asit türevi sekonder (ikincil) bileşiklerdir (Şekil 1.11) (Müller 2001, Boustie ve Grube 2005, Nguyen vd. 2013, Sivas 2015).



Şekil 1.11. *Küçük molekül yapılı liken bileşiklerinin sentez yolakları*

Kaynak: *Varol, 2013, s. 5*

Likenler tarafından sentezlenen bu özel bileşiklerin şu ana kadar; anti-viral, anti-mikrobiyal, anti-protozoal, anti-inflamatuar, anti-pretik, analjezik, ultraviyole ışınlara karşı koruyucu, enzim baskılayıcı, anti-proliferasyon, anti-tümör ve anti-anjiyojenik olmak üzere birçok biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiş; bu nedenle de sürekli artan bir trend ile araştırmacıların dikkatleri likenlerden elde edilen küçük molekül yapılı bileşiklerin üzerine doğru çekilmiştir (Koparal vd. 2010, Song vd. 2012, Shrestha ve Clair 2013, Kim vd. 2015, Koparal 2015, Varol 2015).

Biyolojik ve farmakolojik olarak özel aktivitelere sahip olduğu düşünülen bu küçük molekül yapılı liken bileşiklerinin birçok aktivitesinin çalışılmış olmasına rağmen, ilginç bir şekilde bu bileşiklerin, kanser tedavisinde önemli bir hedef olan anjiyojenez üzerine aktiviteleri hakkında yapılmış çalışmaların sayısının kısıtlı olduğu, yapılan literatür incelemelerinde, gözlemlenmektedir (Varol 2015). Likenlere özgü küçük molekül yapılı bileşiklerin anjiyojenez üzerine aktiviteleri hakkında yapılan ilk çalışma Koparal ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir.

Ağaç kabukları üzerinde gelişim gösterebilen bir liken olan *Pseudevernia furfuracea* (var. ceratea) türünün aseton özütünden izole edilen bir tür depside olan olivetorik asidin; rat adipoz (yağ) dokusundan izole edilmiş endotel hücrelerinin (RATEC) tüp formu oluşturmaları ve anjiyojenezin gerçekleşmesinde temel basamaklardan biri olarak bildiğimiz migrasyonda görevli olan hücre iskeleti elemanlarından, filamentous (ipliksi) aktin proteinlerinin değişimi üzerine olduğunu görmekteyiz (Koparal vd. 2010). Bu çalışmanın sonucunda elde edilen verilere göre; olivetorik asit bileşiğinin düşük toksisiteye (>100 μM) sahip olmasına rağmen, toksik olmayan konsantrasyonlarının RATEC hücrelerinin tüp formu oluşturmalarını engellediği belirlenmiş ve bu endotel hücrelerin bir araya gelerek tüp yapısı oluşturmalarının baskılanmasına dair mekanizma; filamentous aktin proteinlerinin organizasyonlarının, olivetorik asit bileşiğinin aktivitesi sonucunda, bozulması ile açıklanmaya çalışılmıştır (Koparal vd. 2010). Daha sonraki yıllarda Song ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise hakkında en fazla araştırma yapılan ve majör bir liken asidi olarak yaygın bir şekilde likenlerde bulunabilen, dibenzofuran türevi bir liken asidi olan usnik asidin anjiyojenez üzerine aktivitesi incelenmiştir (Song vd. 2012). Song ve arkadaşları usnik asit bileşiğini, likenlerden izole etmek yerine, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) firmasından %98 saflıkta satın alarak anjiyojenez üzerine aktivitesini incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada, usnik asit bileşiğinin anjiyojenez üzerine aktivitesi; VEGF tarafından tetiklenmiş fare kornea anjiyojenez modeli ve piliç embriyolarının korioallantoik membran (CAM) analizi gibi *in vivo* yöntemler ile *in vitro* endotel hücre (HUVEC; insan göbek bağı damar endotel hücresi) tüp oluşumu ve hücre migrasyonu deneyleri gibi yöntemlerin kullanılması sonucunda aydınlatılması amaçlanmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda ise usnik asidin; anti-anjiyojenik bir ajan olarak umut vaat eden bir bileşik olduğu ve anjiyojenezi; vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü–2 (VEGFR-2) aracılı AKT ve ERK1/2 sinyal yolağının bloke edilmesiyle engellediği belirlenmiştir (Song vd. 2012). Koparal tarafından 2015 yılında yayınlanan bir diğer çalışmada ise usnik asit bileşiğinin kiral bir formu olan (S)-(-) -usnik asit bileşiğinin ve bir tür pulvinik asit türevi olan vulpinik asit bileşiğinin anti-anjiyojenik aktiviteleri incelenmiştir (Koparal 2015). HUVEC hücrelerinin tüp formu oluşturmaları üzerine aktivitelerin *in vitro* olarak incelendiği bu çalışmada; her iki

liken bileşiğinin de anti-anjiyojenik aktivite gösterdiği; ancak vulpinik asit bileşiğinin, düşük toksisiteye sahip olması (48 saat için IC_{50}> 231.94±25.4) ve toksik olmayan konsantrasyonlarının endotel hücre tüp formasyonunu engellemesi nedeniyle, usnik asit bileşiğine göre daha umut vaat edici olduğu belirlenmiştir (Koparal 2015). Likenlere özgü olan bu bileşikler ile yapılan çalışmaların yanında, hem likenler tarafından hem de diğer organizmalar tarafından sentezlenebilen emodin ve sekalonik asit-D bileşikleriyle yapılan çalışmalar da dikkat çekmektedir. Bir antrakinon türevi olan emodin bileşiği; likenlere özgü olmayan ve bazı bitkilerin kök ve kabukları ile bazı küflerde bulunabilen bir bileşiktir (Edwards vd. 2003, Tan vd. 2011, Shrimali vd. 2013). Bununla birlikte, emodin bileşiğinin; VEGF-A tarafından tetiklenen anjiyojenezi, reseptör-2'nin (KDR / Flk-1) fosforilasyonu aracılığıyla baskıladığı, hücre migrasyonunu ise fosfatidilinositol 3-kinaz-Cdc42/Rac1 yolağını bloke ederek engellediği belirlenmiştir (Huang vd. 2005, Kwak vd. 2006). Sekalonik asit-D molekülü de, emodin bileşiği gibi likenlere özgü olmayan; ancak likenler tarafından da sentezlenebilen bir bileşik olarak karşımıza çıkmaktadır (Manojlovic vd. 2010, Guru vd. 2015). Sekalonik asidin anjiyojenez üzerine aktivitesi ise 2015 yılında Guru ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma ile aydınlatılmış ve bu bileşiğin anlamlı bir toksik aktivite göstermeden Akt/mTOR/p70S6K sinyal yolağının düzenlenmesiyle VEGF aracılı anjiyojenezi ve HIF-1α'yı (hipoksiyle indüklenen transkripsiyon faktör-1-alfa) baskıladığı belirlenmiştir.

Görüldüğü üzere, literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmasına rağmen, likenler tarafından sentezlenen küçük molekül yapılı bileşiklerin anjiyojenez üzerine gösterdikleri aktiviteler umut vaat edicidir. Bu nedenle; yapılan bu doktora tez çalışmasında, likenlerden izole edilen ve likenlere özgü olan kollatolik asit, alektoronik asit ve kaparetik asit bileşiklerinin anti-kanser, anti-proliferasyon, anti-anjiyojenik, anti-migrasyon ve anti-adezyon aktiviteleri bazı *in vitro* yöntemler ve epigenetik yaklaşımlarla aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

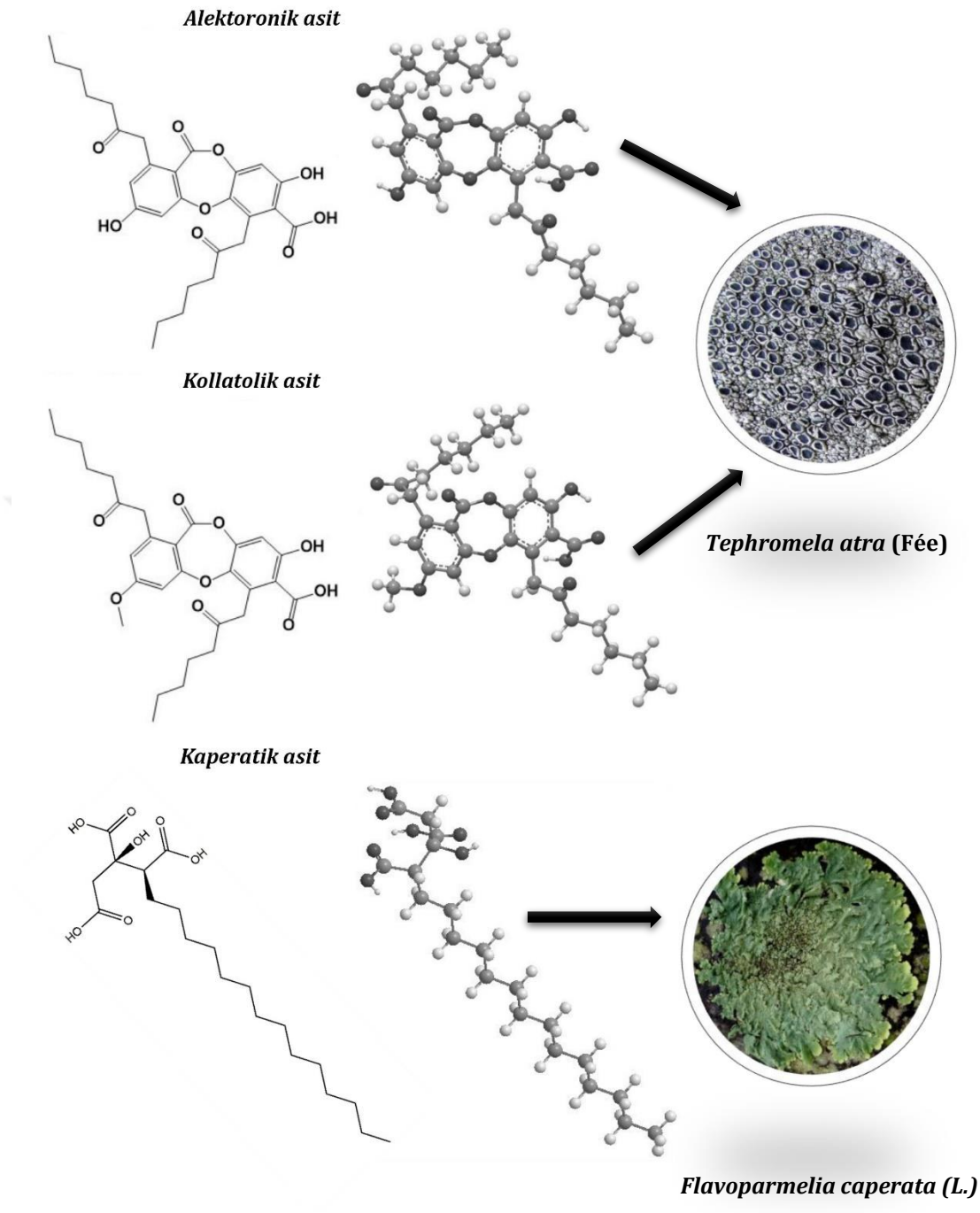
2.1. Küçük Molekül Yapılı Doğal Bileşiklerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Doktora tezi kapsamında çalışılması planlanan alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit isimli küçük molekül yapılı bileşikleri; bünyesinde barındıran liken türleri, bu türlerin özellikleri ve yayılış alanları, literatürde bulunan kaynakların incelemeleri sonucunda belirlenerek arazi çalışmaları planlanmıştır (Huneck ve Yoshimura 1996, Orange vd. 2001, Smith 2009). Literatür taramaları neticesinde, alektoronik asit ve kollatolik asit bileşikleri; *Tephromela atra* Fée isimli liken türünden, kaperatik asit bileşiği ise *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale isimli liken türünden izole edilmiştir. *Tephromela atra* Fée türü likenler; Eskişehir; Sundiken Dağları, Türkmen Tepesi mevkii, 1400 m lokalitede (39º54'26"N 30º41'35"E) bulunan silisli kayalar üzerinden toplanmıştır. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale türü likenler; Bolu; Bolu Abant Dağları, 1080 m yükseltide (40º39'34"N 31º24'05"E) bulunan ormanlık alanda yer alan *Fagus orientalis* ve *Quercus sp.* ağaç kabukları üzerinden toplanmıştır. Söz konusu liken türlerinin belirlenmesi, toplanması, tür tayinin yapılması ve izolasyona hazırlanması çalışmaları; Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi olan Doç Dr. Mehmet CANDAN tarafından standart anahtarlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Smith vd. 2009, Wirth vd. 2013). Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları ise Anadolu Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi olan Doç. Dr. Turgay TAY tarafından gerçekleştirilmiştir. Bileşikler %98'in üzerinde saf olarak kristal formda elde edilmiştir. Toplanacak liken türleri, epifitik (toprağa ihtiyaç duymaksızın ağaçların üzerinde yayılım gösterebilen) özelliğe sahip oldukları için, yapılan arazi çalışmalarında bıçak ve ağaç keskisi kullanılmış ve toplanan liken örnekleri kağıt torbalar içine konularak, toplandığı lokaliteye (bölgeye) ait bilgiler not edilmiştir. Toplanan liken örnekleri; Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumuna (ANES) bağlı laboratuvara götürülerek tür tayinleri gerçekleştirilmiş, havada kurutma yöntemi ile likenler kurutulmuş ve referans örnekler kayıt altına alınmıştır. (Yavuz vd. 2015). Kurutulmuş liken materyalleri; izolasyon çalışmalarına hazır hale getirilmeleri amacıyla, öğütücüde öğütülerek uygun partikül boyutuna getirilmiştir. Küçük molekül yapılı liken bileşiklerinin izolasyonu ve karakterizasyonu daha önceki çalışmalara benzer

şekilde gerçekleştirilmiştir (Yilmaz vd. 2003, Tay vd. 2004, Candan vd. 2007, Koparal vd. 2010, Varol 2013, Koparal 2015, Varol vd. 2016). Kısaca; toplanan liken örnekleri öğütücüde öğütülerek uygun boyutlara parçalanmış ve 20 gram tartılarak 100 ml aseton içinde çözünmüştür. Hazırlanan karışım bir saat kadar sonikasyona tabi tutularak liken materyalleri içinde bulunan moleküllerin aseton içine geçişi hızlandırılmış ve sonik etki ile liken hücrelerinin parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra bir gece oda sıcaklığında bekletilen karışımdan büyük partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla Whatmann No 1 kağıdı kullanılarak filtreleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süzüntünün sterilizasyonu için 0,45 µM çapta porlar içeren filtre kullanılarak ikinci bir filtreleme yapılmış ve çözücü rotavapor yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Elde edilen liken özütünün içerdiği bileşikler ise ince tabaka kromatografisinde (İTK veya TLC) Rf faktörü (alıkonma faktörü) yardımıyla A, C ve G çözücü sistemleri kullanılarak izole edilmiştir (Varol vd. 2015, Varol vd. 2016). Saflaştırılmış bileşiklerin karakterizasyonu ise ^{1}H-NMR, erime noktası, FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) gibi analizler yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin 3D konformasyonları, geometrik ve elektronik yapıları ise B3LYP/3-21G düzeyinde HF teorisi kullanılarak Gaussian 03 yazılımı aracılığıyla belirlenmiştir (Şekil 2.1).

2.2. Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması

Memeli hücre kültürü çalışmaları için steril koşulların gerekli olmasından dolayı; ısıya dayanıklı cam ve plastik malzemeler ile bazı sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak, otoklavda 121 ˚C ve 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika; diğer cam ve metal malzemeler ise alüminyum folyolara sarılı olarak kuru hava sterilizatörü içerinde 180 ˚C' de 2 saat süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Isı ile bozulan sıvı solüsyonlar ve diğer bazı kimyasallar ise 0,2 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirilerek steril edilmiştir.



Şekil 2.1. *Likenlerden izole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları (2D ve 3D) ve izole edildikleri likenler*

2.3. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Kültür Koşulları

2.3.1. İnsan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D) hücre kültürü

T-47D hücreleri (ATCC® HTB-133™); ilk kez 1979 yılında Keydar ve arkadaşları tarafından; göğüs kanseri olgusu rastlanan 54 yaşındaki bir bayanın sağ meme duvarının delinmesi yoluyla, boşluktan alınan sıvıdan (plevral efüzyon sıvısı) izole edilmiş olan; epitel hücre morfolojisine sahip bir hücre hattıdır (Keydar vd. 1979). Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan T-47D hücreleri; Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından desteklenen 1502F068 numaralı proje kapsamında ATCC firmasından satın alınarak kültüre edilmiş, stoklanmış ve Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında sıvı azot tankları içinde saklanmış olan hücrelerdir. T-47D hücreleri; %10 Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), %1 penisilin-streptomisin solüsyonu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ve 1.5 gr/L sodyum bikarbonat ile 200 ünite/L bovine insülin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) içeren RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) medyum ortamında ve 75 cm^2 flasklar içerisinde, 37 ˚C'de, %5 CO_2 içeren bir ortamda kültüre edilmiştir.

2.3.2. İnsan meme bezi epitelyum IV. evre adenokarsinoma (HCC1428) hücre kültürü

HCC1428 hücreleri (ATCC® CRL-2327™); ilk kez 1995 yılında Ahmadian ve arkadaşları tarafından; göğüs kanseri olgusu rastlanan ve ailesinde de kanser olgusuna rastlanmış olan (anneannesinde) 49 yaşındaki, Kafkas ırkına mensup bir bayandan izole edilmiş; cisplatine karşı dirençli, metastatik özellikte ve IV. faz (evre) kanser hücreleri olarak tanımlanmaktadır (Ahmadian vd. 1997, Gazdar vd. 1998, Sakai vd. 2008). Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan HCC1428 hücreleri; Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından desteklenen 1502F068 numaralı proje kapsamında ATCC firmasından satın alınarak kültüre edilmiş, stoklanmış ve Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında sıvı azot tankları içinde saklanmış olan hücrelerdir. HCC1428 hücreleri; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve 1 gr/L sodyum bikarbonat içeren

RPMI-1640 medyum ortamında ve 75 cm^2 flasklar içerisinde, 37 °C'de, %5 CO_2 içeren bir ortamda kültüre edilmiştir.

2.3.3. İnsan göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücre kültürü

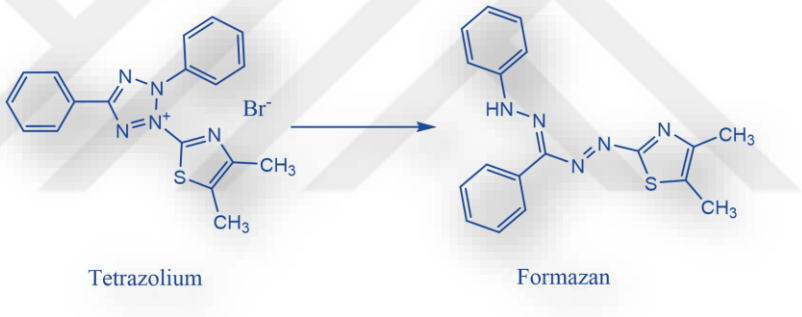
HUVEC hücreleri (ATCC® CRL-1730™); ilk kez 1984 yılında Hoshi ve arkadaşları tarafından, insan göbek bağı damarından izole edilerek stoklanmış olan primer özellikli ve sağlıklı damar endotel hücreleridirler (Jaffe vd. 1973, Hoshi ve McKeehan 1984). Primer endotel hücrelerin izolasyon çalışmalarının ise 1920'li yılların öncesine dayandığı ve bu hücrelerin damar dokusundan izole edilmeleri nedeniyle, *in vitro* koşullarda da kılcal damar benzeri veya tüp benzeri yapılar oluşturabildikleri bilinmektedir (Lewis 1921, Maruyama 1963). Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan HUVEC hücreleri; daha önceden ATCC (American Type Culture Collection) firmasından satın alınarak kültüre edilmiş, stoklanmış ve Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında sıvı azot tankları içinde saklanmış olan 4-5 pasaj numarasına sahip hücrelerdir. Hücreler; %20 FBS, %1 penisilin-streptomisin solüsyonu, 1.5 gr/L sodyum bikarbonat ve 30 mg/L olacak şekilde, bovine hipofiz bezinden izole edilmiş, endotel hücresi büyüme takviyesi (ECGS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) içeren Ham's F12 (Ham's Nutrient Mixture F12; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) medyum ortamında ve 75 cm^2 flasklar içerisinde, 37 ˚C'de, %5 CO_2 içeren bir ortamda kültüre edilmiştir.

2.4. MTT Hücre Canlılığı Testi

Bilindiği üzere, yeni bir ilaç etken maddesinin keşfi ve aktivitelerinin belirlenmesi süreci; genellikle uzun, vakit alan, yoğun çaba gerektiren ve buna rağmen başarısızlıkla sonuçlanma ihtimali yüksek olan bir süreçtir (Gura 1997, Kamphaus vd. 2000). Kanser hücreleri ise gerek geliştikleri doku içinde, gerekse bulundukları doku tipine bağlı olarak heterojen bir yapı sergilemekte ve tedavi amacıyla uygulanan ilaçlara karşı gösterdikleri tepkiler farklılık arz edebilmektedir (Gerlinger ve Swanton 2010, Winograd vd. 2013, Varol 2016a). Bu nedenle, ilaç etken maddesi adaylarının *in vitro* hücre kültürü yöntemleriyle aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında; farklı dokulardan izole edilmiş hücrelere karşı aktivitelerinin belirlenmesi faydalı görünmektedir ki bu nedenle; doktora tez

çalışmasında kolorimetrik olarak ölçüm yapılabilen, basit, güvenilir ve ucuz bir test yöntemi olduğu MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) hücre canlılığı testi kullanılmıştır (Gerlier ve Thomasset 1986).

Mosmann tarafından 1983 yılında keşfedilen MTT [3-(4,5- dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide] hücre canlılığı test yöntemi; suda çözünebilen sarı renkli tetrazolium tuzlarının, mitokondriyal metabolik aktivitelerin gerçekleşmesi sırasında, elektron taşıma sistemlerinin (ETS) elemanları olan primidin nükleotid kofaktör NADH, NADPH dehidrojenazlar ve N-etilmaleimide (NEM) duyarlı flavin oksidazların aktivitesi sonucunda, suda çözünemeyen mor renkli formazan tuzlarına indirgenmesi ve indirgenen formazan tuzlarının 570 nm dalga boyundaki ışığı absorbe edebilme (emme) kapasitelerine dayanmaktadır (Şekil 2.2) (Mosmann 1983, Liu vd. 1997).



Şekil 2.2. *MTT tetrozolium ve formazan tuzlarının kimyasal yapısı.*

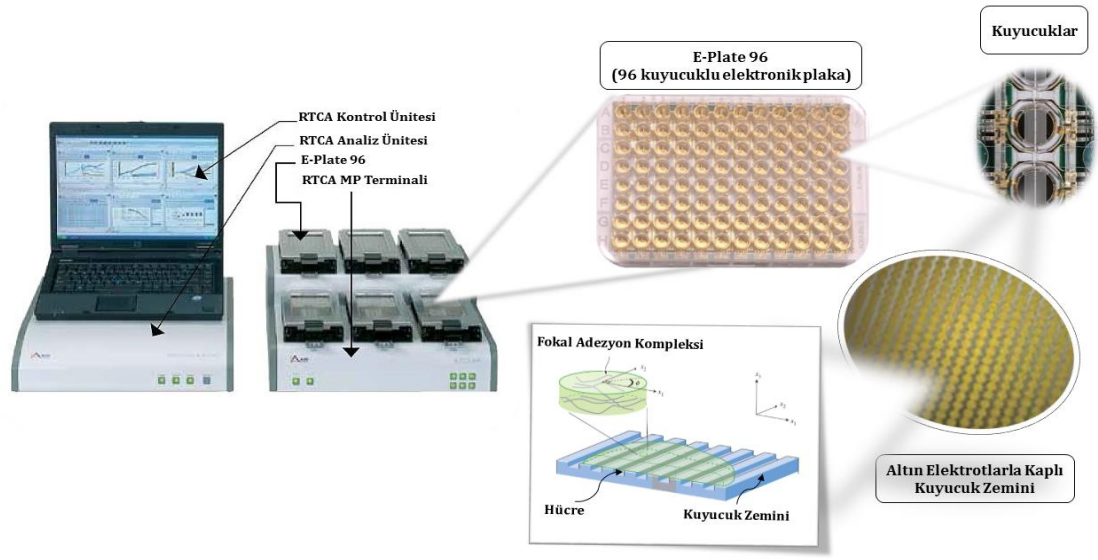
Doktora tez çalışması kapsamında; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma ve HCC1428 insan meme epitelyum 4. evre adenokarsinoma hücreleri kullanılarak likenlerden izole edilen alektoronik, kollatolik ve kaperatik asit bileşiklerinin kanser hücreleri üzerine aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Sağlıklı hücre hattı olarak ise HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri tercih edilmiştir.

T-47D hücreleri $15x10^3$ hücre/kuyucuk, HCC1428 hücreleri $15x10^3$ hücre/kuyucuk ve HUVEC hücreleri $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) ekildikten sonra 24 saat süre ile %5 CO_2 ve 37 °C altında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelerin medyumu uzaklaştırılarak yerine; test bileşiklerinin 25-

50-100-200-400 µM konsantrasyonlarını içeren medyum ilave edilmiştir. Test maddeleri, DMSO (dimetil sülfoksit) içinde çözüldüğü için; gerçekleştirilen deneylerde negatif kontrol olarak çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. DMSO'in final konsantrasyonu % 0,3 den daha fazla değildir. Stok çalışma solüsyonu her çalışma için yeniden hazırlanarak kullanılmıştır. Hücreler; 24 veya 48 saat süreyle %5 CO_2 ve 37 °C altında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, test bileşiklerini içeren medyum hücrelerden uzaklaştırılmış ve hücreler 5µg/ml MTT solüsyonu içeren yeni medyum ortamında 2 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, MTT içeren medyum ortamı hücrelerden uzaklaştırılarak, hücrelerin üzerine 100 µl DMSO ilave edilmiş ve 5 dakika beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansite (OD) değerleri ELISA cihazında (ELx808™; BioTek® Instruments, Inc; Winooski, Vermont, USA) 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez ve 8 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiş ve grafiklerde yıldız (*) işareti kullanılarak belirtilmiştir.

2.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA MP) Kullanılarak Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA; Real Time Cell Analyzer) sistemleri; xCELLigence (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA) markasıyla piyasaya sürülmüş olan cihazları içermektedir ve RTCA MP modeli; altın elektrotlarla kaplanmış özel plakaların (E-Plate 96; Roche Applied Science, Mannheim, Germany) zeminine yapışan hücrelerin oluşturdukları fokal adezyon komplekslerinin neden olduğu elektriksel empedansın (öz direnç) gerçek zamanlı olarak ölçülmesi yoluyla; hücre proliferasyonu, hücre morfolojisinde meydana gelen değişimler ve hücrelerin plaka zeminine tutunma (adezyon) kapasiteleri gibi özellikleri ölçebilmektedir (Şekil 2.3) (Ke vd. 2011).



Şekil 2.3. *Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) MP modeli tanıtımı ve çalışma prensibi*

Doktora tez çalışmasında, likenlerden izole edilen küçük molekül yapılı test bileşiklerinin hücre proliferasyonu üzerine aktiviteleri; RTCA MP sistemi ve bu sisteme uyumlu 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak üretici firmanın direktifleri ve literatür bilgileri doğrultusunda belirlenmiştir (Ke vd. 2011, Özkay vd. 2016). Kısaca; RTCA MP sistemi deneylere başlanmadan en az 16 saat öncesinden %5 CO_2 içeren 37 °C sıcaklığındaki inkübatör içine alınarak, bu ortama uyum sağlaması sağlanmış ve deneyler için RTCA MP sistemin yazılımında gerekli ayarlamalar yapılmıştır. Plakalara 100 µl/kuyucuk olacak şekilde hücre medyumu ilave edilerek sistem içine yerleştirilmiş ve 30 dakika boyunca medyumun neden olabileceği elektriksel değişim "background measure – zemin ölçümü" olarak ölçülmüştür. Daha sonra, plakalar çıkarılarak; T-47D hücreleri $15x10^3$ hücre/kuyucuk, HCC1428 hücreleri $15x10^3$ hücre/kuyucuk ve HUVEC hücreleri $10x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde plakalara ekilmiş ve plakalar tekrar RTCA MP terminaline yerleştirilerek 2. aşama ölçüme başlanmıştır. Yaklaşık 24 saat süren bir inkübasyon zamanından sonra 2. aşama sonlandırılarak plakalara uygun konsantrasyonlarda test bileşikleri ilave edilmiş ve plakalar tekrar RTCA MP terminaline yerleştirilerek 3. aşama program üzerinden başlatılmıştır. 72 saat boyunca her 60 dakikada bir kez empedans ölçümü alınarak hücrelerin proliferasyonunda meydana gelen değişiklikler izlenmiş ve inkübasyon süresi sonunda 3. Aşama da sonlandırılarak

elde edilen veriler analiz edilmiştir. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 2 kez ve 16 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.6. Endotel Hücre Tüp Formasyon Testi

Endotel hücre tüp formasyon deneyleri; ilaç etken bileşiklerinin anjiyojenez üzerine aktivitelerinin araştırıldığı bilimsel çalışmalarda, kolay uygulanabilen, tekrarlanabilir ve ucuz bir *in vitro* model olarak, sıklıkla kullanılmaktadır (Ponce 2009, Koparal vd. 2010). Doktora tez çalışması kapsamında da; göbek bağı damar endotel hücreleri (HUVEC) kullanılarak, likenlerden izole edilen test bileşiklerinin anjiyojenez üzerine aktiviteleri matrijel tüp formasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Kısaca; endotel hücre büyüme medyumu (EBM-2; Lonza Ltd, Basel, Switzerland) içerisinde süspanse halinde hazırlanan ($4x10^5$ hücre/ml) HUVEC hücreleri matrijel (Corning Inc., NY, USA) üzerine ekilerek liken asitlerinin toksik olmayan konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Matrijel üzerine ekilen HUVEC hücreleri 12 saatlik bir süre zarfında farklılaşarak kendi aralarında bir ağ oluşturmakta ve tüp benzeri yapıları meydana getirmektedirler (Koparal vd. 2010). Bu nedenle, hücreler 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda; hücrelerin tüp ağı oluşumları inverted mikroskop yardımıyla (Olympus IX70) 10X'lik büyütmede incelenmiş ve DP70 kamera ile fotoğraflanmıştır. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez ve 2 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Endotel Hücre Migrasyonunun İncelenmesi

Bilindiği üzere, anjiyojenezin gerçekleşebilmesi için endotel hücrelerinin göç etmesi gerekmektedir (Wiley vd. 2011, Vanhollebeke vd. 2015, Betz vd. 2016, Ulrich vd. 2016). Bu nedenle, likenlerden izole edilen test bileşiklerinin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinin migrasyonu üzerine aktiviteleri RTCA DP modeli ve bu sisteme uygun olarak tasarlanmış olan 16 kuyucuklu plakalar (CIM-16) kullanılarak belirlenmiştir. CIM-16 kodlu plakalar (Roche Applied Science, Mannheim, Germany); 2 bölüm ve 3 parçadan meydana gelmektedir. En altta bulunan parçaya hücre medyumu ve kemoatraktan (FBS vb.), altın kaplı elektrotları içeren orta parçaya ise hücreler ile serum içermeyen medyum eklenmektedir. En

üstte bulunan parça ise plakanın kapağı olarak görev görmektedir (Şekil 2.4) (Bird ve Kirstein 2009).



Şekil 2.4. *Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) DP modeli ve CIM-16 kodlu plakanın parçaları*

Yapılan doktora tez çalışmasında; likenlerden izole edilen bileşiklerin toksik olmayan konsantrasyonlarının endotel hücre göçü üzerine aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla; CIM-16 plaka sisteminin en alt parçasına 160 µl/kuyucuk, üst plaka kısmına ise 30 µl/kuyucuk olacak şekilde hücre medyumu eklenerek "background measure – zemin ölçümü" işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, üst plaka kısmındaki kuyucuklara $1x10^4$ HUVEC hücresi/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılarak hücreler test bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. 24 saat boyunca RTCA DP modeli kullanılarak her 60 dakikada bir kez ölçüm alınmış ve test bileşiklerinin hücre göçü üzerine etkileri grafikler halinde gözlemlenmiştir. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 2 kez ve 4 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiş ve grafiklerde yıldız (*) işareti kullanılarak belirtilmiştir.

2.8. Tümör Hücresi Yayılım (İnvazyon) Testi

Kanser olgularının tedavisine yönelik olarak gerçekleştirilen ilaç etken madde keşfi araştırmalarında; kanser hücrelerinin büyümesi, gelişmesi ve metastazı gibi süreçleri doğrudan etkileyen endotel hücre migrasyonu ve anjiyojenez üzerine

yapılan deneyler kadar kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonu üzerine yapılan incelemeler de büyük öneme sahiptir (Shaw 2005). Bu nedenle; yapılan doktora tez çalışmasında, likenlerden izole edilen küçük molekül yapılı bileşiklerin HCC1428 ve T-47D hücrelerinin invazyon özellikleri üzerine aktiviteleri daha önce uygulanmış protokoller ışığında belirlenmiştir (Repesh 1988, Shaw 2005, Valster vd. 2005, Moutasim vd. 2011). Tümör hücresi invazyon testleri; 24 kuyucuklu plakalara (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) yerleştirilen 6,5 mm çapında ve 8 µm por genişliğine sahip polikarbonat membran yapılı geçirgen kuyucuklar (Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts; Corning Inc., NY, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler sırasında, 24 kuyucuklu plakalara kemoatraktan olarak %10 FBS içeren hücre medyumu eklenerek, geçirgen polikarbonat membranlar medyum içine daldırılmış ve mebranların üst yüzeyi de 50 µl/kuyucuk olacak şekilde matrijel ile kaplanmıştır. Matrijel kaplanan kuyucukların üzerine ise T-47D hücreleri $6x10^4$ hücre/kuyucuk veya HCC1428 hücreleri $6x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde serum içermeyen medyum ile ekilmiş ve test bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonları hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda geçirgen kuyucukların üzerinde kalan hücreler ve matrijel steril pamuklu çubukla uzaklaştırılmış ve matrijeli delerek alta geçen hücreler DAPI boyama yapılarak preparatlar hazırlanmış ve floresan ataçmana sahip Olympus BX50 mikroskop ile incelenerek 100x büyütme ile fotoğrafları çekilmiştir (Otto 1990, Varol 2013). İstatistiksel analizler için SPSS programında tek yönlü ANOVA testi kullanılmış ve Microsoft Excel kullanılarak grafikler hazırlanmıştır. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 2 kez ve 2 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.9. Hücre Adezyon Testi

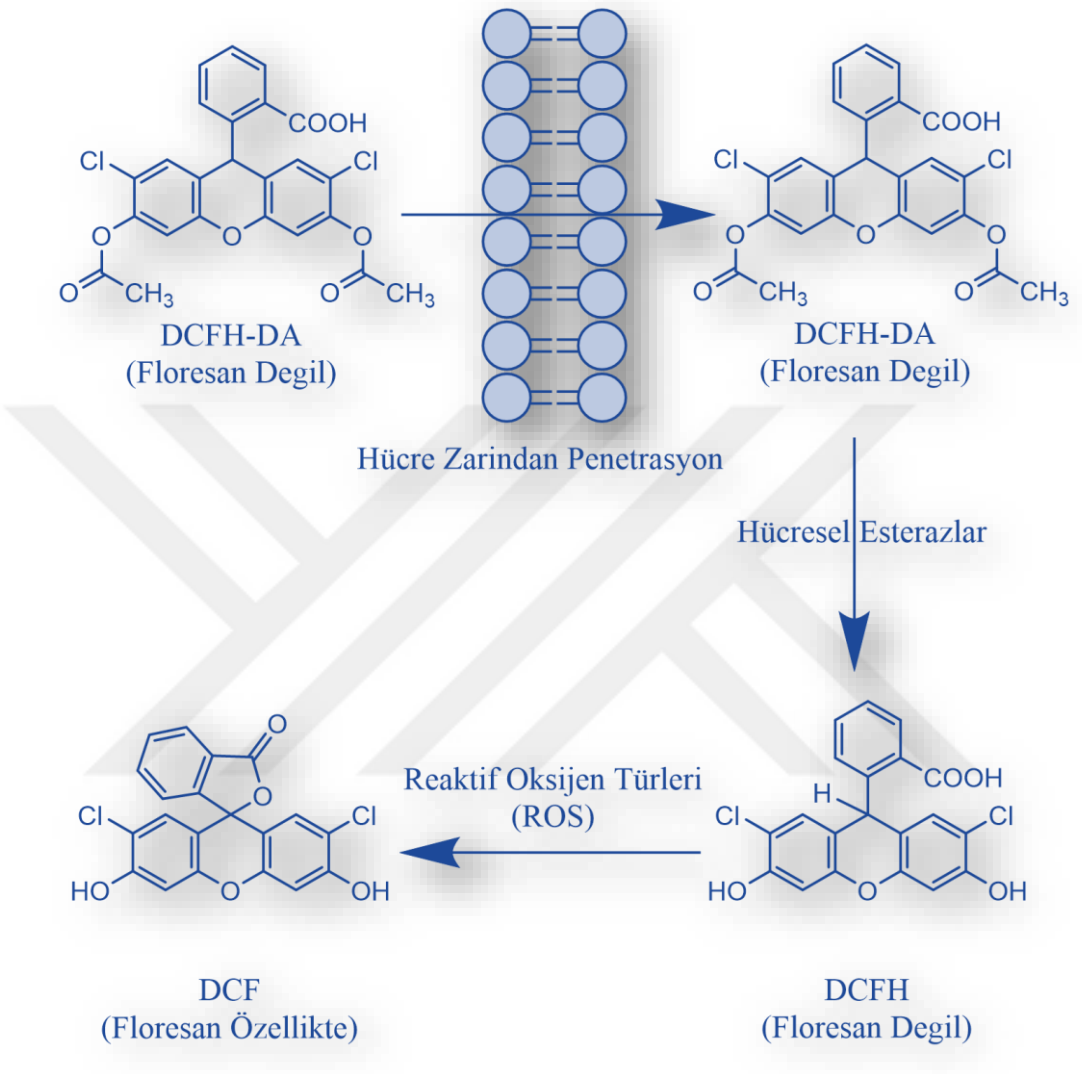
Bilindiği üzere hücrelerin adezyonu hem anjiyojenezde hem de metastaz ve invazyon süreçlerinde büyük önem taşımaktadır (Folkman 1971, Folkman 1992, Klagsbrun ve Moses 1999, Carmeliet ve Jain 2000, Rundhaug 2005, Pipinikas vd. 2008, Betz vd. 2016). Bu nedenle, yapılan doktora tez çalışması kapsamında izole dilen test bileşiklerinin; T-47D ve HCC1428 meme kanseri hücreleri ile HUVEC göbek bağı damar endotel hücrelerinin adezyonu üzerine aktiviteleri incelenmiştir

(Humphries 2001). Kısaca; T-47D hücreleri 6 x10^4 hücre/kuyucuk, HCC1428 hücreleri 6x10^4 hücre/kuyucuk, HUVEC hücreleri 4x10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96'lık plakalara ekildikten hemen sonra liken asitlerinin toksik olmayan konsantrasyonlarına maruz bırakılarak 30 dakika süre ile %5 CO_2 ve 37 °C içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, hücrelerden test bileşiklerini içeren medyum uzaklaştırılarak, PBS (fosfatlanmış tuz solüsyonu: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH_2PO_4, 8 µM $NaHPO_4$; pH 7.3) ile yıkama işlemi uygulanmış ve plakanın zeminine yapışan hücreler 5µg/ml MTT içeren medyum ile 2 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, MTT içeren medyum ortamı hücrelerden uzaklaştırılarak, hücrelerin üzerine 100 µl DMSO ilave edilmiş ve 5 dakika beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin OD değerleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez ve 8 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS programında tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc olarak Tukey testi kullanılmıştır. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiş ve Microsoft Excel kullanılarak hazırlanan grafiklerde anlamlı farklılıklar (*) ile gösterilmiştir.

2.10. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Birikiminin Ölçümü

Hücre içinde oluşturulan reaktif oksijen türleri; tümör anjiyojenezi öncesinde ve tümör anjiyojenezi sonrasında, birçok hücre içi ve hücreler arası sinyal mekanizmalarında etkili olabilmektedir (Granger ve Kvietys 2015, Michiels vd. 2016). Doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen hücre içi ROS miktar tayini testleri; ROS deney kiti (OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Green Fluorescence); Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ROS ölçüm testinin temel prensibi; hücre içine difüze olma yeteneğinde olan ve floresan özellik taşımayan DCFH-DA [2', 7'-Diklorodihidrofloresin diasetat] molekülünün hücrelere verilmesi sonrasında; bu molekülün hücre içinde, hücresel esterazların aktivitesi sonucunda, diasetat grubunu kaybederek yine floresan özellikte olmayan DCFH [2', 7'-Diklorodihidrofloresin] moleküllerine dönüşmesi ve DCFH moleküllerinin ise hücre içinde birikmiş olan reaktif oksijen türleri tarafından aktive edilerek floresan ışıma gösterebilen ve 480 nm dalga boyundaki floresan ışık tarafından uyarılarak, bu ışığı 530 nm dalga boyunda yansıtabilen DCF [2', 7'-Diklorodihidrofloresein]

moleküllerine dönüşmesine dayanmaktadır (Şekil 2.5) (Eruslanov ve Kusmartsev 2010, Varol 2013).



Şekil 2.5. *DCF-DA molekülünün hücre içindeki metabolizması ve ROS aktivitesi sonucu DCF oluşumu*

Doktora tez çalışması kapsamında izole edilen liken bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarının hücre içinde biriken ROS miktarı üzerine aktivitelerini belirlemek amacıyla 96 kuyucuklu siyah dipli plakalara (Greiner Cellstar®; Greiner Bio-One North America Inc., North Carolina, USA) ; T-47D hücreleri $15x10^3$ hücre/kuyucuk, HCC1428 hücreleri $15x10^3$ hücre/kuyucuk ve HUVEC hücreleri $10x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat süreyle, 37 °C ve %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, hücreler test bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarına 24

saat süreyle maruz bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, test bileşiklerini içeren medyum hücrelerden uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, hücreler üzerine üretici firmanın direktifleri doğrultusunda serum içermeyen medyum içinde hazırlanan DCFH-DA boyası verilerek 15 dakika süreyle inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda DCF molekülü miktarı florometrik elizada (Gemini EM Microplate Reader, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA), 480/530 nm dalga boyunda okutulmuştur. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez ve 4 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS programında tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc olarak Tukey testi kullanılmıştır. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiş ve Microsoft Excel kullanılarak hazırlanan grafiklerde anlamlı farklılıklar (*) ile gösterilmiştir.

2.11. 8-hidroksideoksiguanozine (8-OHdG) Eliza Testi

Hücre içinde oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarında meydana gelen artışın; DNA'nın çift zincirli yapısında kırılmalara neden olduğu ve DNA onarım mekanizmasının yanlış bir şekilde çalışmasına yol açtığı bilinmektedir (Sallmyr vd. 2008). 8- hidroksideoksiguanozine (8-OHdG) ise hücrelerde maruz kaldığı oksidatif stresin ve karsinogenezin önemli belirteci olarak karşımıza çıkmaktadır (Valavanidis vd. 2009). Bu nedenle, yapılan doktora tez çalışması kapsamında izole edilen liken bileşiklerinin; DNA üzerinde oluşabilecek oksidatif DNA hasar miktarı üzerine aktiviteleri oksidatif DNA hasarı ELISA kiti (OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation); Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA) kullanılarak belirlenmiştir. Kısaca; 25 cm^2 flasklar içerine T-47D hücreleri $1.5x10^6$ hücre/flask, HCC1428 hücreleri $1.5x10^6$ hücre/kuyucuk, HUVEC hücreleri $1x10^6$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat süreyle 37 °C ve %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, hücreler test bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarına 24 saat süreyle maruz bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, hücreler PBS; PBS-EDTA ve tripsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kullanılarak flask zemininden kaldırılmış ve santifüj işlemine tabi tutulmak üzere 50 ml'lik santrifüj tüplerinde toplanmıştır. Daha sonra; hücreler 2500 g'de 5 dakika süreyle Sorvall Stratos santrifüj (ThermoFisher Scientific™ Company LLC., Pittsburgh, PA) kullanılarak çöktürülmüştür. Çöktürülen

hücreler 1 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve bu hücrelerden; DNA izolasyonu kiti (Wizard® Genomic DNA Purification Kit; Promega Corporation, Madison, USA) kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda, DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar 8-OHdG miktar tayini deneylerinde kullanılmış ve oksidatif DNA hasar miktar tayini; oksidatif DNA hasarı ELISA kitinin üreticisi tarafından belirlenen direktifler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 2 kez ve 2 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS programında tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc olarak Tukey testi kullanılmıştır. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiş ve Microsoft Excel kullanılarak hazırlanan grafiklerde anlamlı farklılıklar (*) ile gösterilmiştir.

2.12. Hücrelerin Epigenetik Özellikleri Üzerine Aktivitelerin Belirlenmesi

Kanser hücrelerinin büyümesi ve gelişiminde olduğu gibi tümör anjiyojenezi, metastazı ve invazyonu sırasında da çeşitli epigenetik değişimler meydana geldiği ve bu değişikliklerin kanser hücrelerinin malignant kapasiteleri üzerine etkili olduğu geniş bilimsel çevrelerce kabul görmektedir (Gama-Sosa vd. 1983, Gronbaek vd. 2007, Iacobuzio-Donahue 2009, Esteller 2011). Epigenetik değişimlerden biri olan DNA metilasyonu; memeli hücrelerinde CpG dinükleotid bölgelerinde gerçekleşmekte ve genellikle bu bölgeler gen promotor bölgeleri olarak görev üstlenmektedir. DNA metilasyonunda meydana gelen hasarlar ise kanser dahil birçok hastalığa neden olmakta ve bu tarz olgularda metilasyon miktarında azalma gözlemlenmektedir (Riggs ve Jones 1983). Kanser olgularında malignant özelliğe bağlı olarak DNA metilasyonunda azalma meydana geldiği ve aktif olmayan gen bölgelerinin açılarak aktive edildiği bilinmektedir (Gama-Sosa vd. 1983). DNA metilasyonu miktarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesinde ise farklı yöntemler izlenebilmektedir (Ari 2013). Bu yöntemlerden biri de, DNA materyalinden 5'-metilsitozin (5-mC) miktarının ölçülmesi olarak karşımıza çıkmaktadır (Gama-Sosa vd. 1983, Curtis ve Goggins 2005).

Bu doktora tez çalışmasında; likenlerden izole edilen küçük molekül yapılı doğal bileşiklerin T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücrelerinin epigenetik yapıları

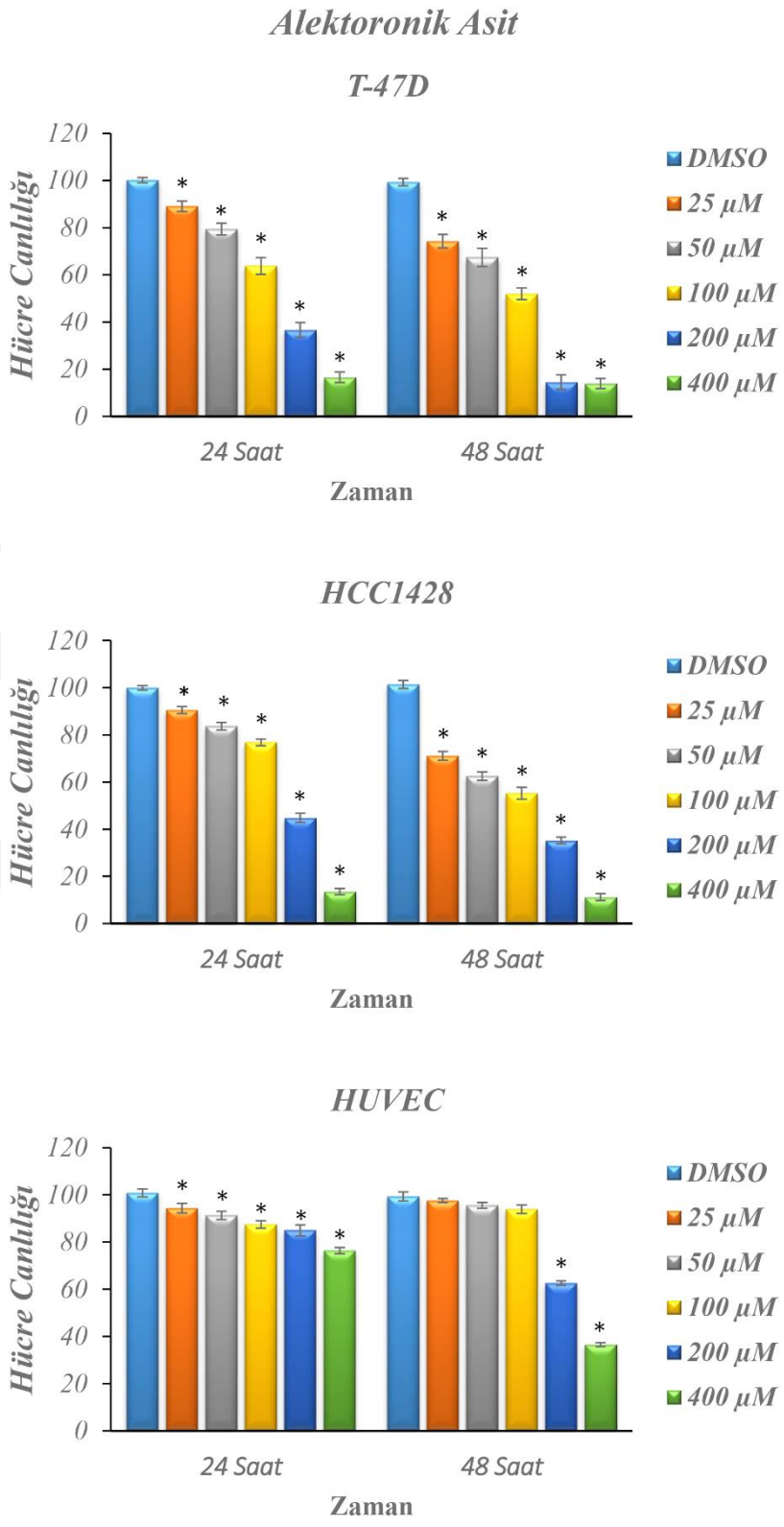
üzerine aktiviteleri DNA metilasyon kiti (5-Methylcytosine DNA ELISA kit; Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY) kullanılarak 5mC miktarının ölçülmesi prensibine dayalı olarak belirlenmiştir. Kısaca; 25 cm^2 flasklar içerine T-47D hücreleri $1.5x10^6$ hücre/flask, HCC1428 hücreleri $1.5x10^6$ hücre/kuyucuk, HUVEC hücreleri $1x10^6$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat süreyle 37 °C ve %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, hücreler test bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarına 24 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Daha sonra, hücrelerden DNA izolasyonu kiti yardımıyla DNA izolasyonu yapılmış ve 5-mC miktarı DNA metilasyon kiti yardımıyla üretici firmanın direktifleri doğrultusunda tek zincirli DNA kullanılarak ELISA cihazında (ELx808™; BioTek® Instruments, Inc; Winooski, Vermont, USA) ölçülmüştür. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 2 kez ve 2 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS programında tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc olarak Tukey testi kullanılmıştır. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiş ve Microsoft Excel kullanılarak hazırlanan grafiklerde anlamlı farklılıklar (*) ile gösterilmiştir.

3. BULGULAR

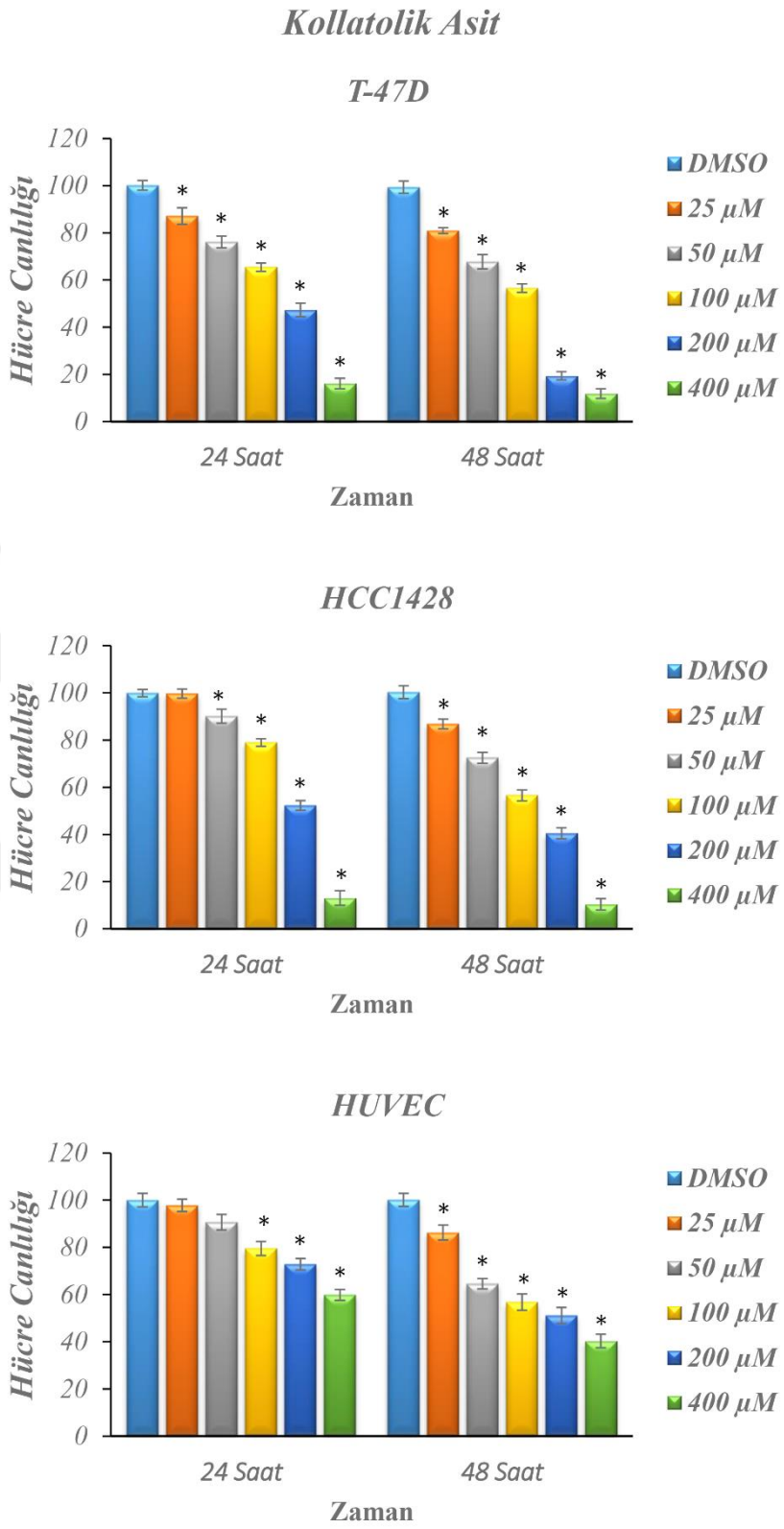
3.1. MTT Hücre Canlılığı Belirleme Testi Sonuçları

Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; farklı doku ve organizmalardan izole edilen hücreler üzerine toksik aktivitelerinin belirlenebilmesi amacıyla; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4. evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri kullanılarak MTT hücre canlılığı belirleme testleri gerçekleştirilmiştir.

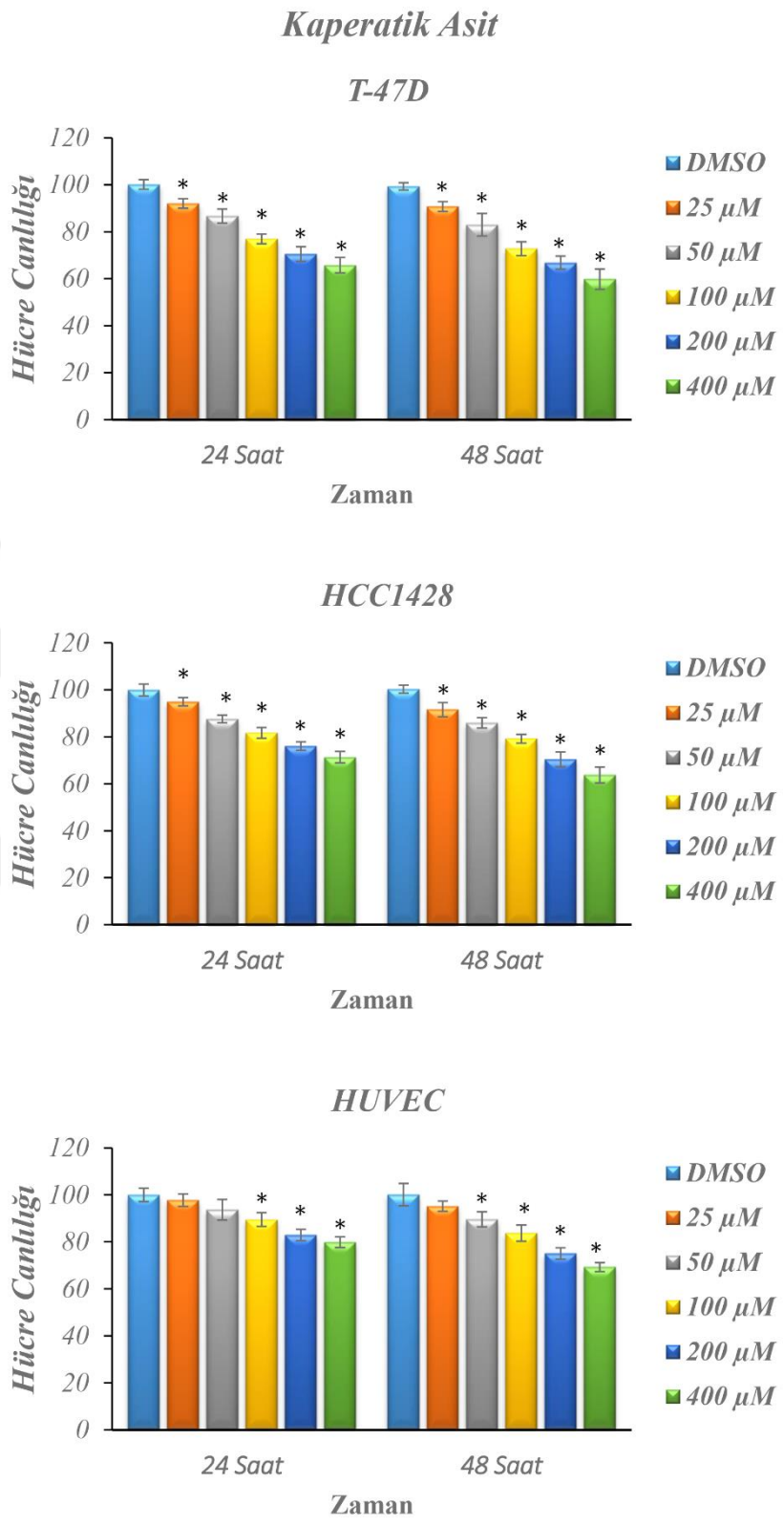
Alektoronik asit bileşiğinin 25-50-100-200 ve 400 μM konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine aktivitelerinin incelenmesi sonucunda elde edilen verilere göre; kanser hücreleri üzerine toksik aktivitesinin sağlıklı endotel hücreleri üzerine olan toksik aktivitesinden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bilindiği gibi alektoronik asit ve kollatolik asit; aynı liken türünden izole edilmiş olan bileşiklerdir ve bu iki bileşik kimyasal olarak da birbirine benzerlik göstermektedir (Şekil 2.1). Bu nedenle, kollatolik asit bileşiğinin genel olarak alektoronik aside paralel bir sitotoksisiteye sahip olduğu gözlemlenmiş. Ancak; kollatolik asit bileşiğinin sağlıklı HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitesinin de alektoronik asidin göstermiş olduğu sitotoksik aktiviteden daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.2). Kaperatik asit; hem kimyasal yapısı bakımından hem de izole edildiği organizma bakımından alektoronik asit ve kollatolik asit bileşiklerinden farklılık göstermektedir (Şekil 2.1). Bu bileşiğin diğer liken asitlerine göre daha düşük sitotoksisiteye sahip olduğu belirlenmiş ve sağlıklı HUVEC hücreleri dahil olmak üzere diğer hücreler üzerine olan sitotoksik aktivitesinin birbirine paralel olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.1. *Alektoronik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine aktivitesinin MTT test yöntemiyle belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*



Şekil 3.2. *Kollatolik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine aktivitesinin MTT test yöntemiyle belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*



Şekil 3.3. *Kaperatik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine aktivitesinin MTT test yöntemiyle belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*

3.2. Liken Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemiyle (RTCA MP) Belirlenmesi

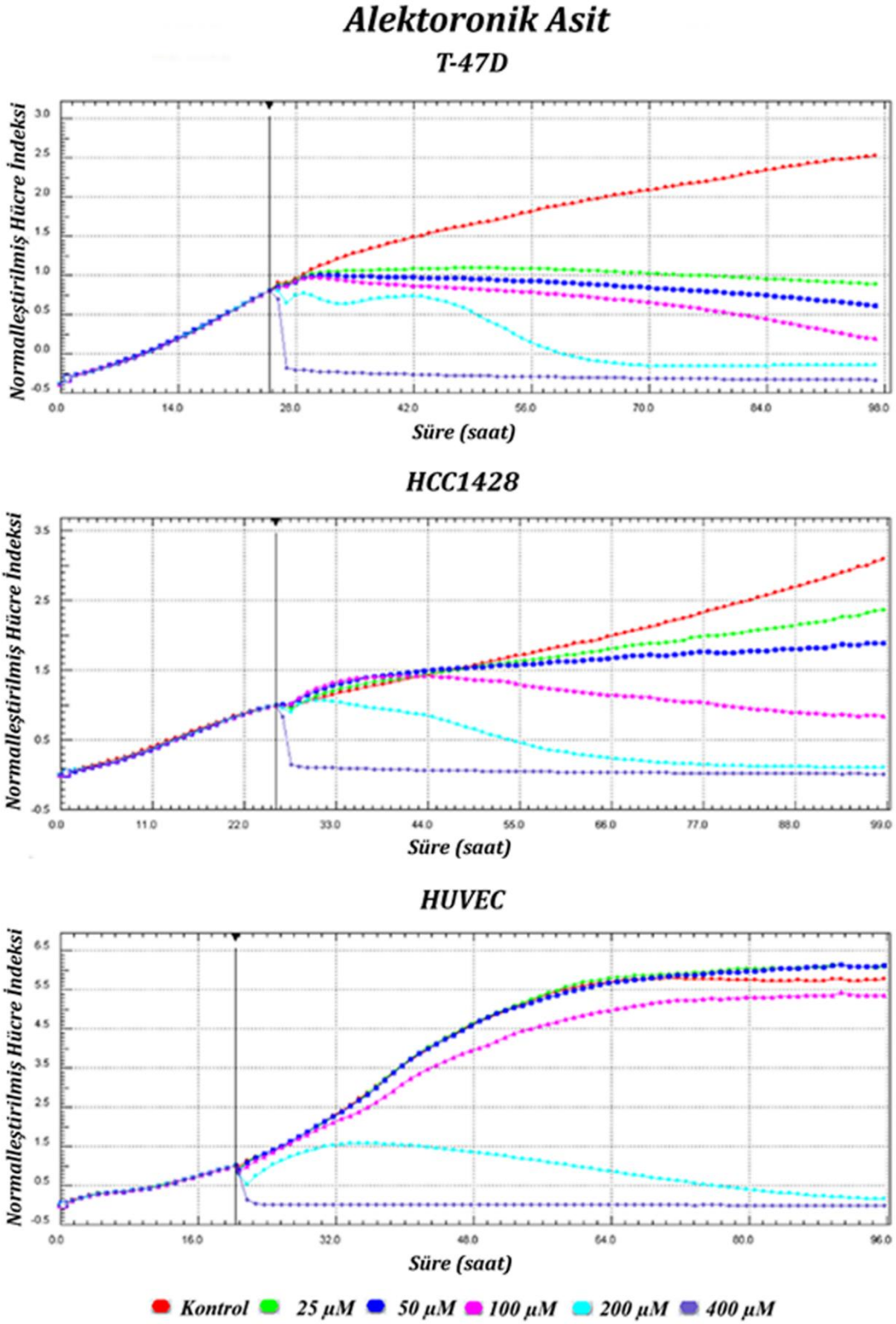
Likenlerden izole edilen küçük molekül yapılı bileşiklerin; HCC1428, T-47D ve HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine aktiviteleri, yeni ve güvenilir bir yöntem olarak kabul gören gerçek zamanlı hücre proliferasyonu analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak, her 60 dakikada bir hücrelerin oluşturdukları fokal adezyon komplekslerinin neden olduğu elektriksel empedansın ölçülmesiyle belirlenmiştir. Bilindiği üzere, RTCA MP sistemi; altın elektrotlarla kaplanmış özel plakalara ekilen hücrelerin zemine yapışmaları sırasında oluşturdukları fokal adezyon komplekslerinin neden olduğu elektriksel empedansın (öz direnç) gerçek zamanlı olarak ölçülmesi yoluyla; hücre proliferasyonu, hücre morfolojisinde meydana gelen değişimler ve hücrelerin plaka zeminine tutunma (adezyon) kapasiteleri gibi özellikleri ölçülebilmektedir.

3.2.1. Alektoronik asit

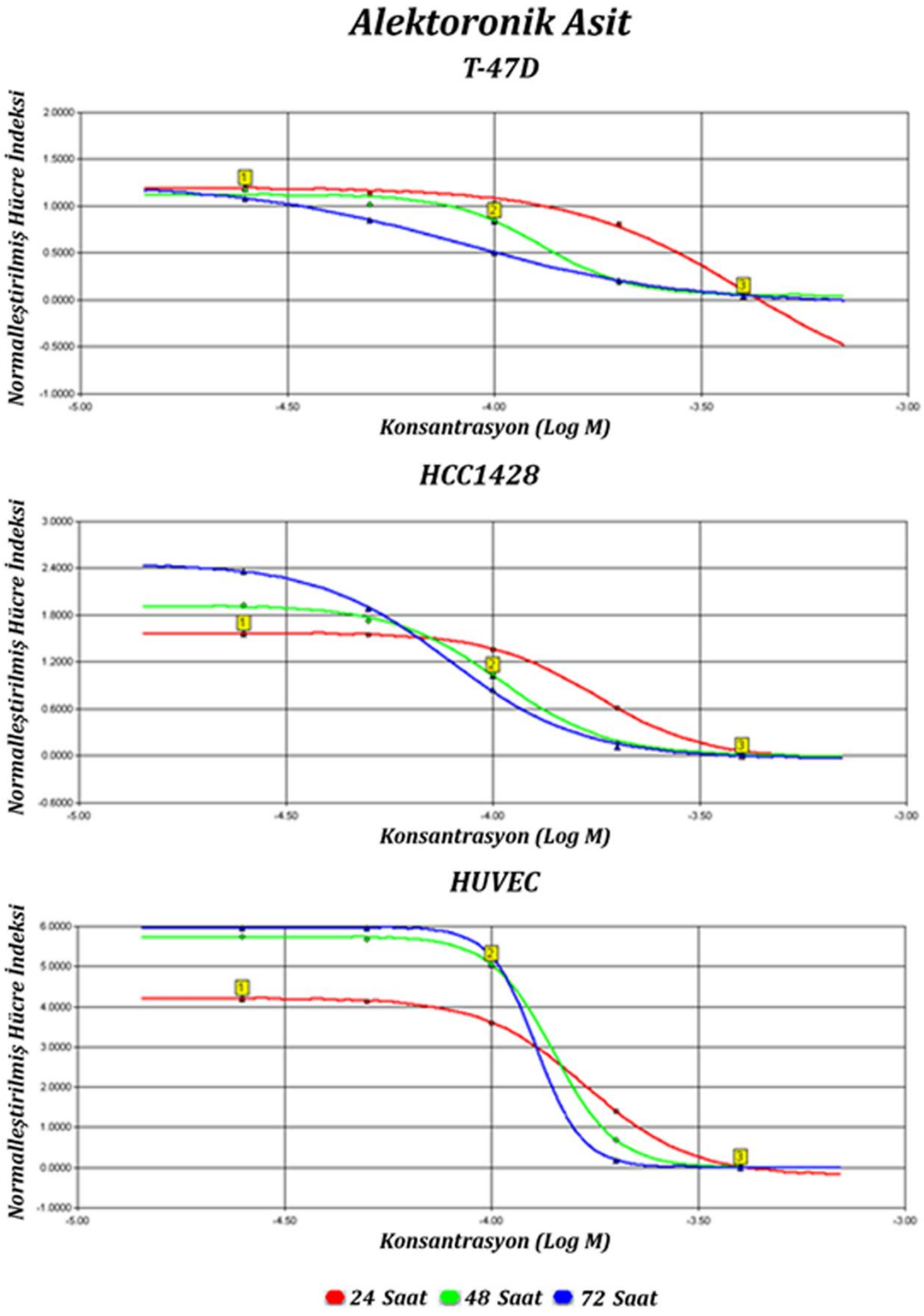
Alektoronik asit bileşiğinin T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitesi, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak, RTCA MP sisteminin kullanılmasıyla belirlenmiş ve IC_{50} değerleri cihaz tarafından hesaplanmıştır (Tablo 3.1). Veriler incelendiğinde; 25-50 ve 100 µM gibi düşük konsantrasyonların HUVEC hücreleri üzerine yüksek sitotoksisiteye sahip olmadığı (Şekil 3.4); ancak T-47D ve HCC1428 hücrelerinin canlılığını zamana bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Şekil 3.4). Ayrıca, alektoronik asidin T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitesinin konsantrasyona ve zamana bağlı IC_{50} eğrileri de elde edilmiştir (Şekil 3.5). Zamana bağlı olarak, 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri incelendiğinde; ilk 24 saatte T-47D üzerine olan sitotoksik aktivitenin en az (412,14 µM), HUVEC hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitenin ise en fazla (170,82 µM) olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.1). Bununla birlikte, alektoronik aside maruz kalma süresi uzadıkça hücrelerin üzerine olan aktivitede değişimler meydana gelmekte ve IC_{50} değerlerinde kayda değer bir düşüş gözlemlenmektedir (Şekil 3.6).

Tablo 3.1. *Alektoronik asit bileşiğinin 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri*

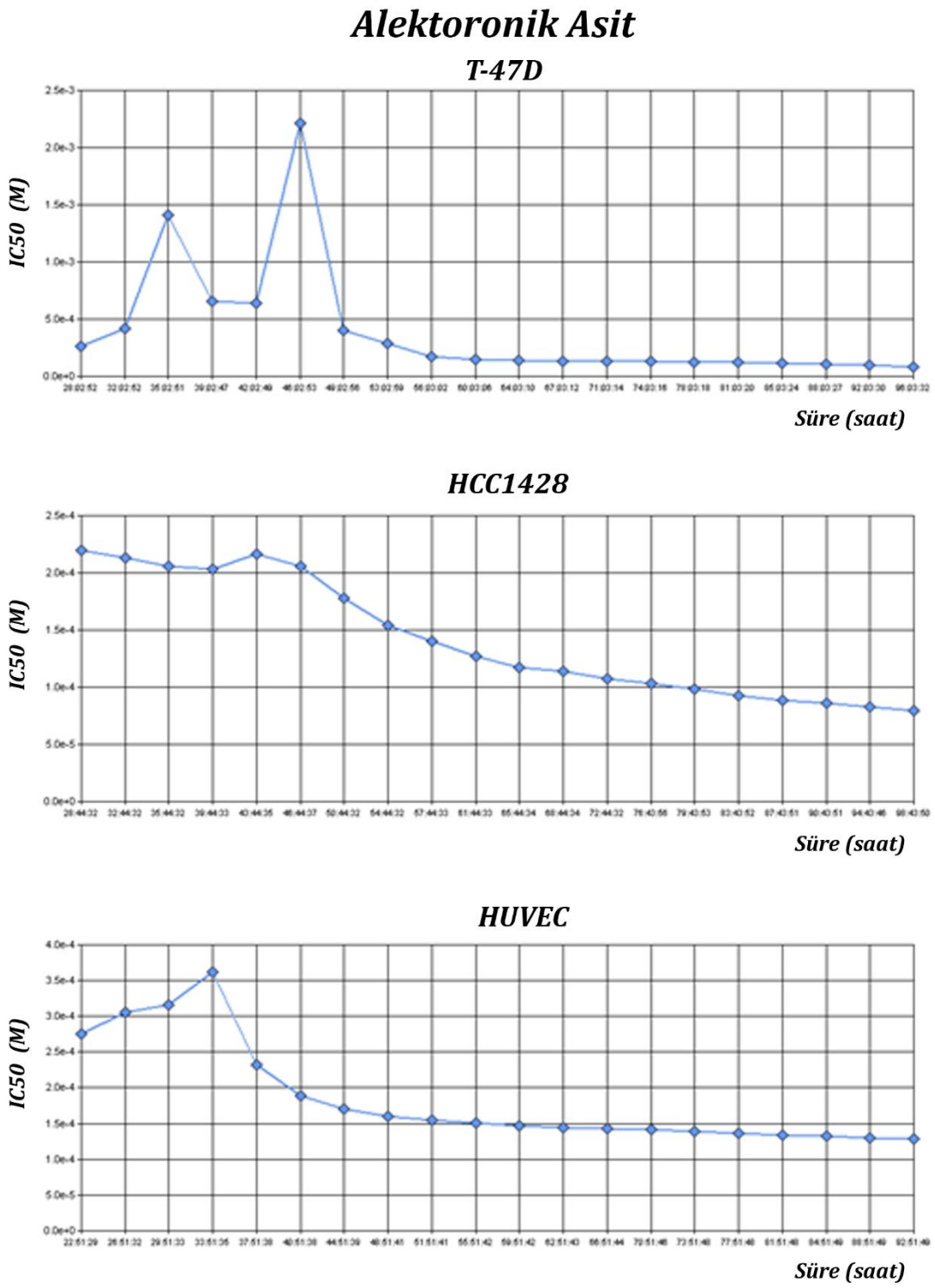
Normalleştirilmiş Hücre İndeksi Kullanılarak Belirlenen IC50 Değerleri (µM)			
Alektoronik Asit			
	T-47D	**HCC1428**	**HUVEC**
24 Saat	412,14	178,28	170,82
48 Saat	130,09	104,90	141,98
72 Saat	84,37	79,26	128,93



Şekil 3.4. *Alektoronik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi*



Şekil 3.5. *Alektoronik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, , HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenen konsantrasyon-normalleştirilmiş hücre indeksi bağımlı IC_{50} eğrileri*



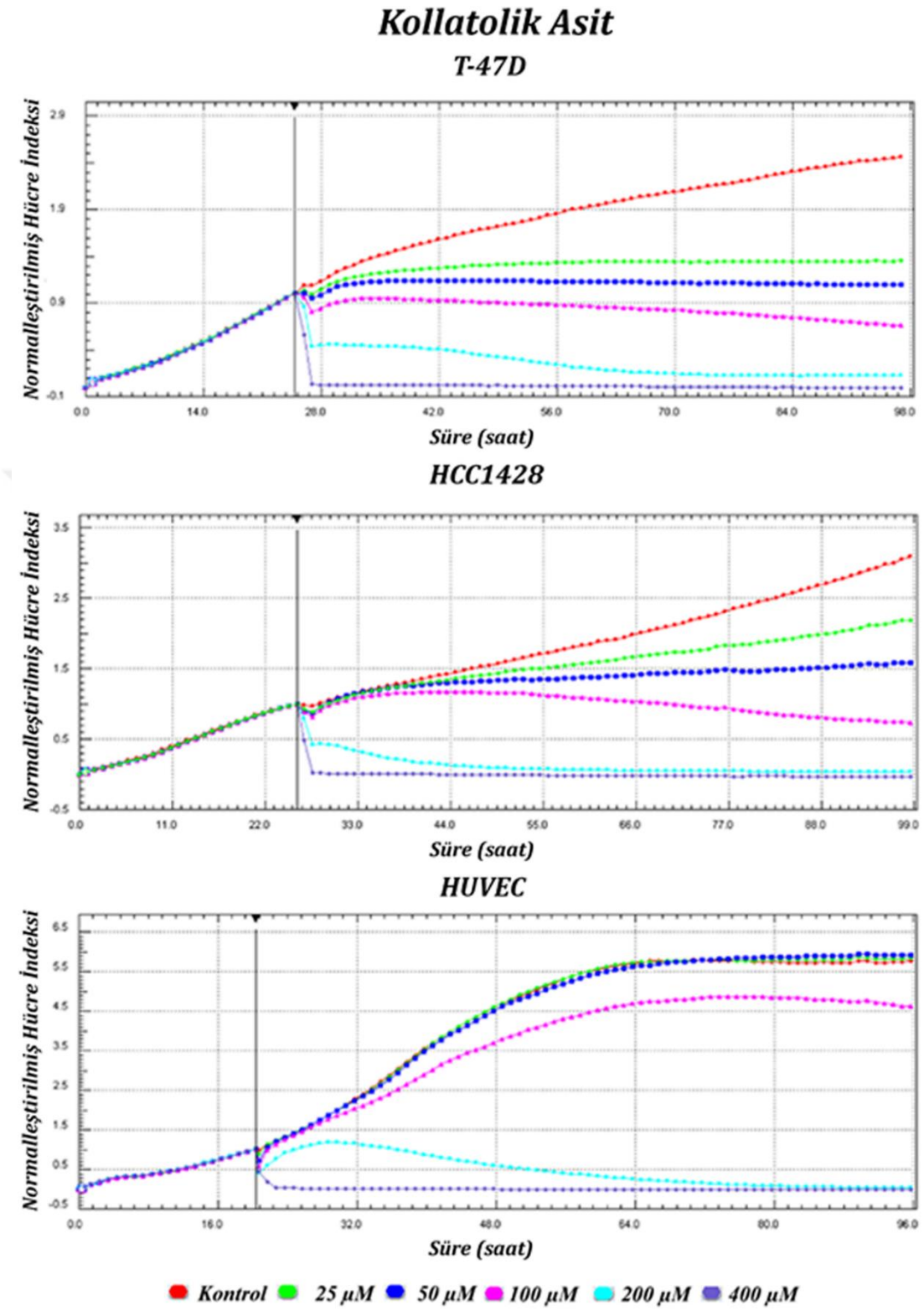
Şekil 3.6. *Alektoronik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin geçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi sonucu elde edilen, zamana bağlı IC_{50} eğrileri*

3.2.2. Kollatolik asit

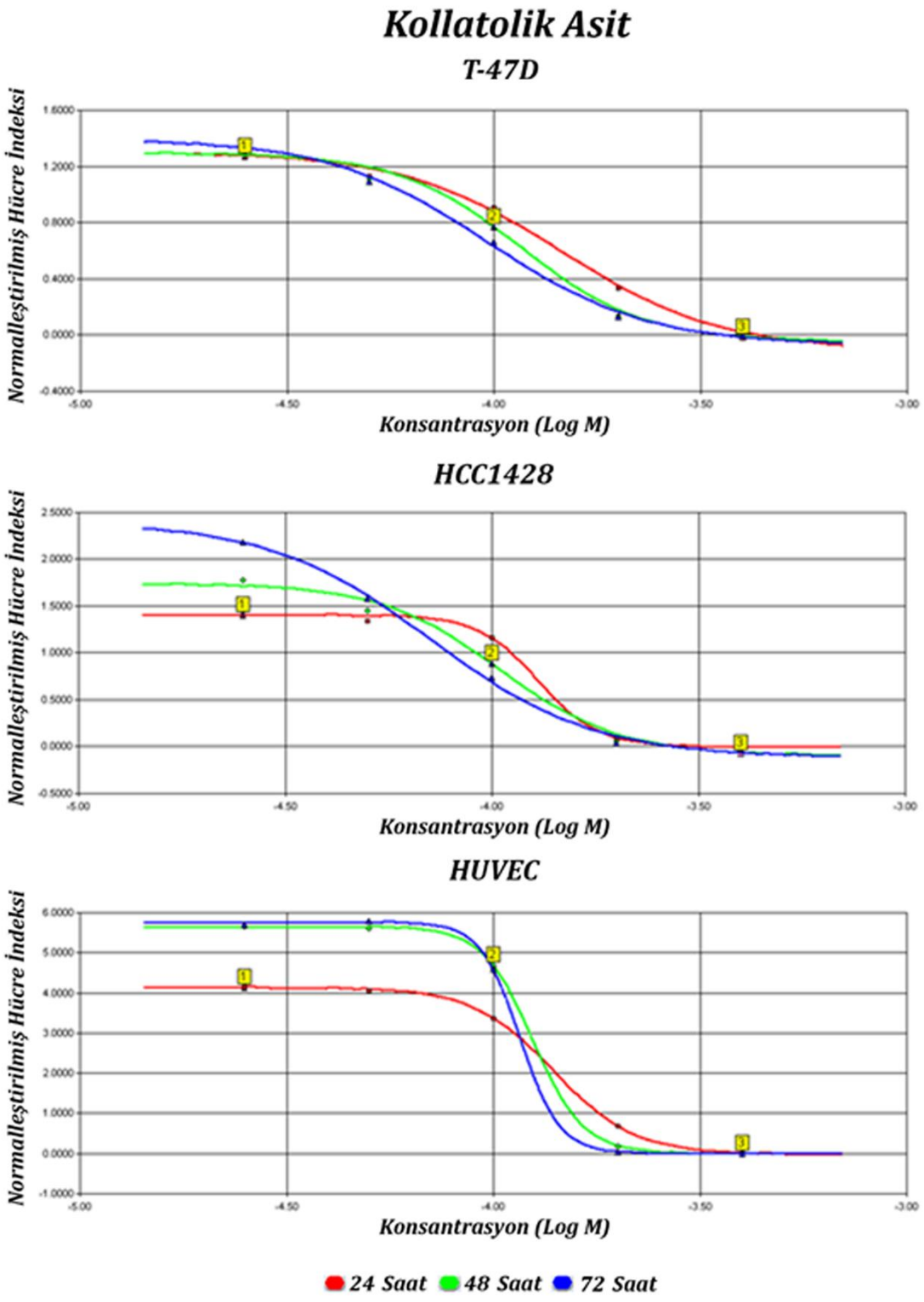
Kollatolik asit bileşiğinin T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitesinin RTCA MP sistemi ile incelenmesi sonucunda elde edilen verilere göre alektoronik asit bileşiğinden daha fazla sitotoksik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.7). T-47D hücreleri üzerine aktivitesi incelendiğinde; kollatolik asidin zamana bağlı olarak sitotoksik aktivitesinde artış olduğu (Şekil 3.7 ve Şekil 3.9) ve 72 saat sonunda 102,18 µM konsantrasyonunun IC_{50} değeri olarak belirlendiği gözlenmiştir (Tablo 3.2). HCC1428 hücrelerinin; cisplatin dirençli, 4. evre ve metastatik özellikte meme adenokarsinoma hücreleri olmalarına rağmen, hem alektoronik asidin hem de kollatolik asidin HCC1428 hücrelerinin canlılığını T-47D meme duktal karsinoma hücrelerine göre daha fazla etkilemesi ilginçtir (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2). Kollatolik aside ait IC_{50} değerlerinin ise alektoronik aside göre daha yatay eğriler oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.9). 24, 48 ve 72 saatlik konsantrasyon-zaman bağımlı IC_{50} değerleri incelendiğinde ise eğrilerin birbirine yakın bir seyre sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.8).

Tablo 3.2. *Kollatolik asit bileşiğinin 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri*

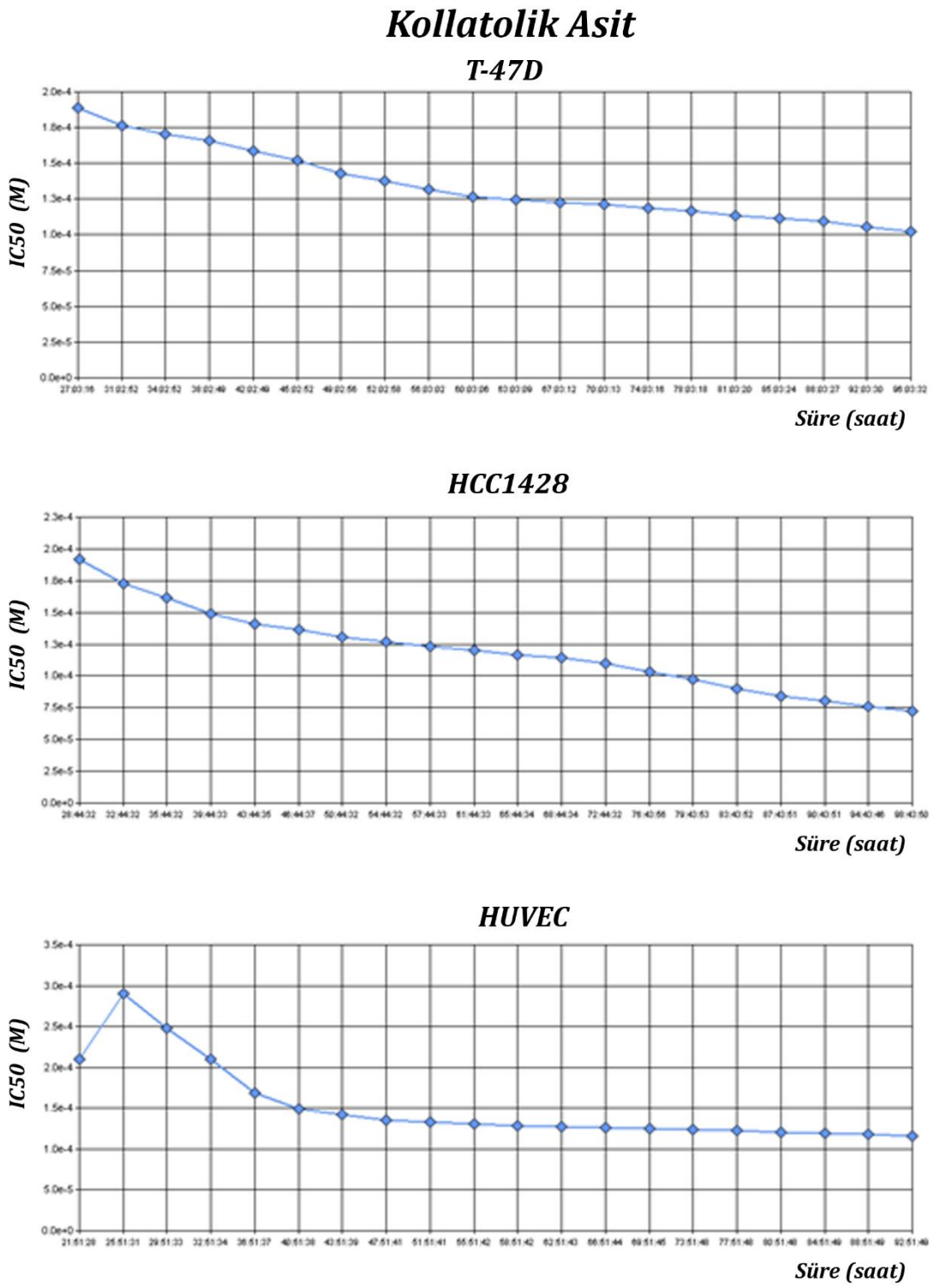
Normalleştirilmiş Hücre İndeksi Kullanılarak Belirlenen IC50 Değerleri (µM)			
Kollatolik Asit			
	T-47D	**HCC1428**	**HUVEC**
24 Saat	146,56	130,14	140,63
48 Saat	116,76	105,06	125,12
72 Saat	97,11	71,57	116,47



Şekil 3.7. *Kollatolik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi*



Şekil 3.8. *Kollatolik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, , HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenen konsantrasyon-normalleştirilmiş hücre indeksi bağımlı IC_{50} eğrileri*



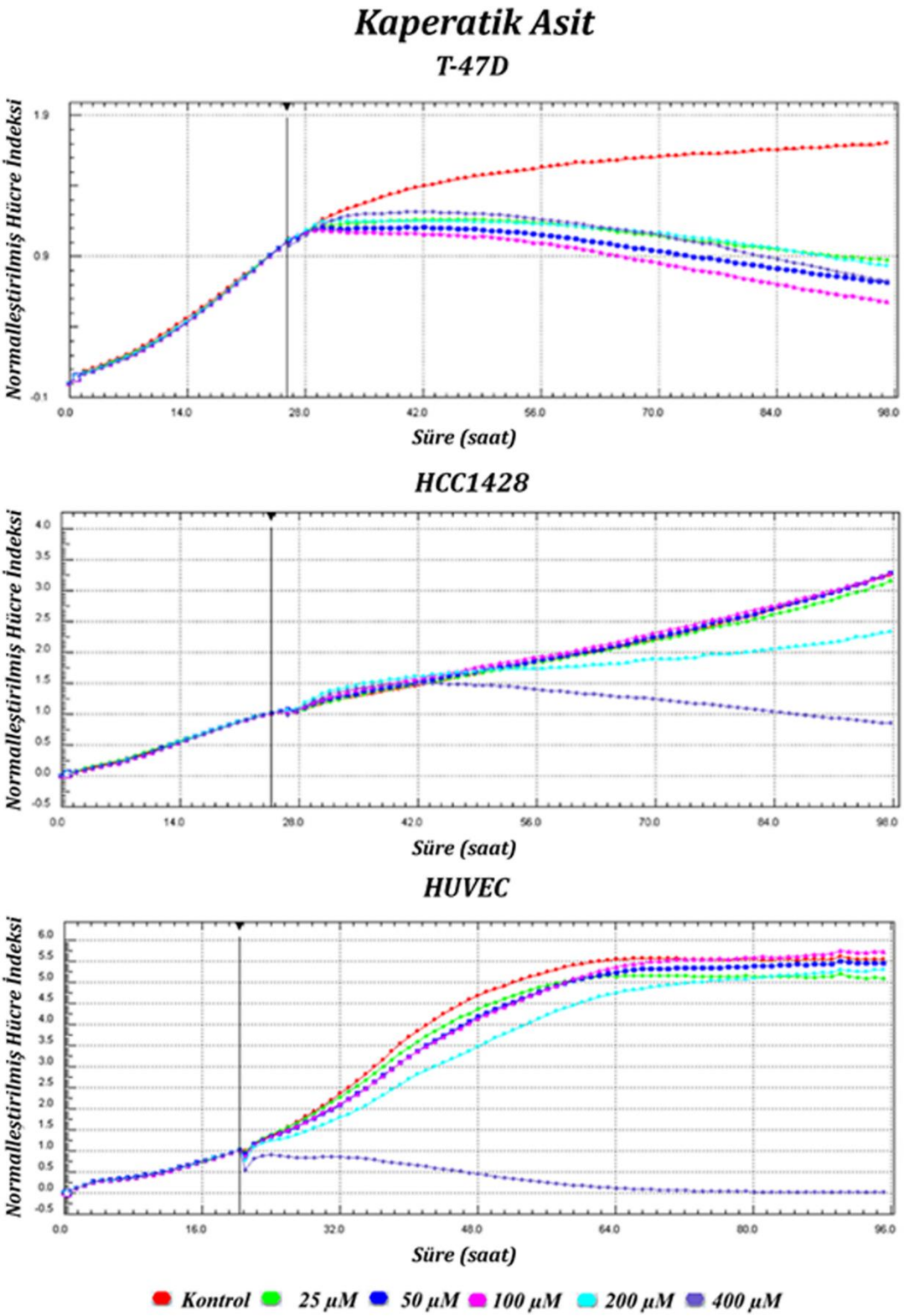
Şekil 3.9. *Kollatolik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin geçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi sonucu elde edilen, zamana bağlı IC_{50} eğrileri*

3.2.3. Kaperatik asit

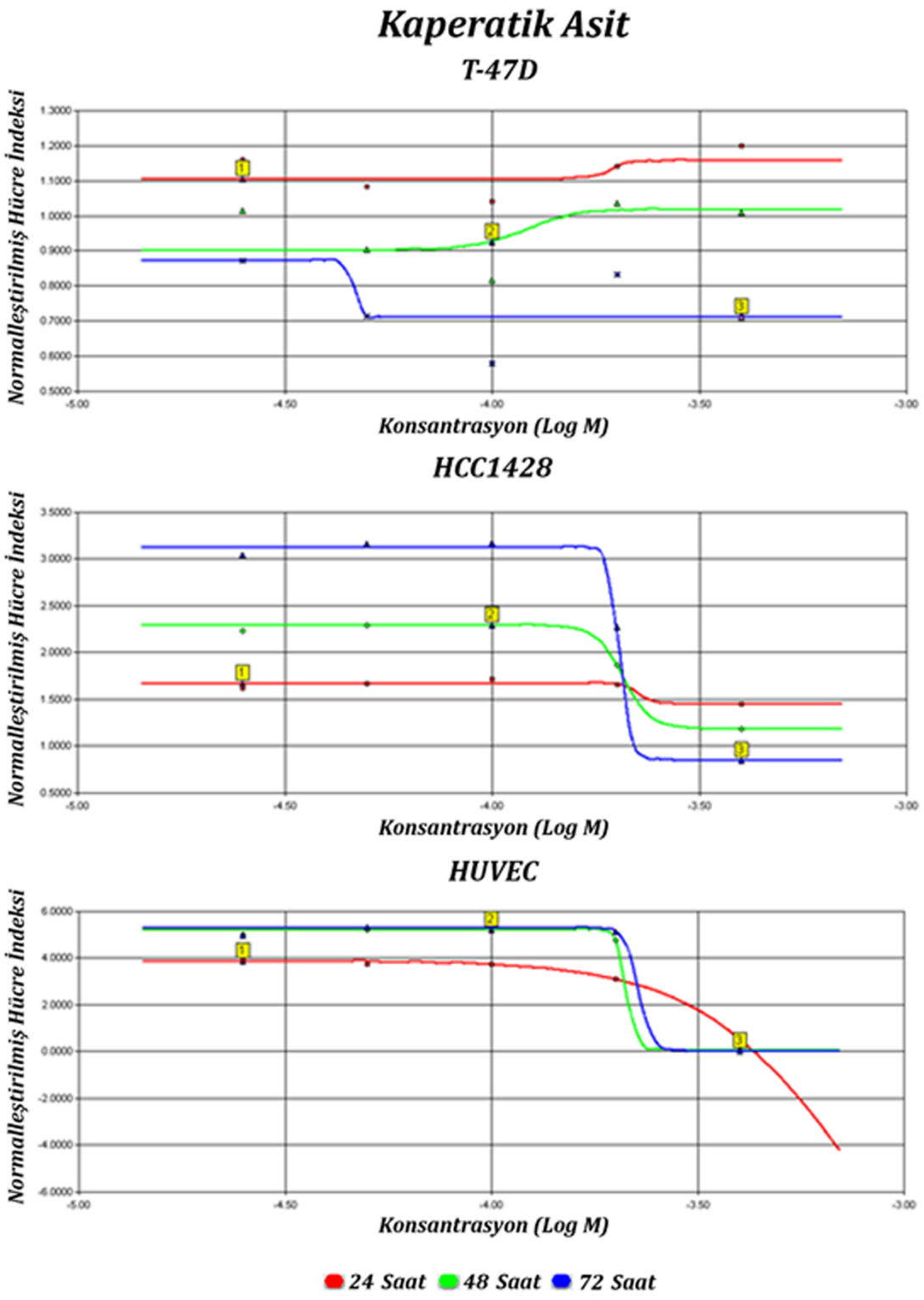
Kaperatik asit bileşiğinin T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesinin RTCA MP sistemi kullanılarak incelenmesi sonucunda elde edilen verilere göre; kaperatik asit bileşiği, en yüksek sitotoksik aktiviteyi T-47D hücreleri üzerine gösterirken, en düşük sitotoksik aktiviteyi HUVEC hücreleri üzerine göstermiştir (Şekil 3.10). Uygulanan kaperatik asit konsantrasyonlarından 25-50 ve 100 µM gibi konsantrasyonlar HUVEC ve HCC1428 hücreleri üzerine anlamlı bir toksik aktivite göstermezken, T-47D hücrelerinin canlılığında zamana bağlı olarak azalmaya neden olmuştur (Şekil 3.10 ve Şekil 3.12). IC50 değerleri ve elde edilen eğriler incelendiğinde ise genellikle yatay bir seyir izledikleri belirlenmiştir (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12).

Tablo 3.3. *Kaperatik asit bileşiğinin 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri*

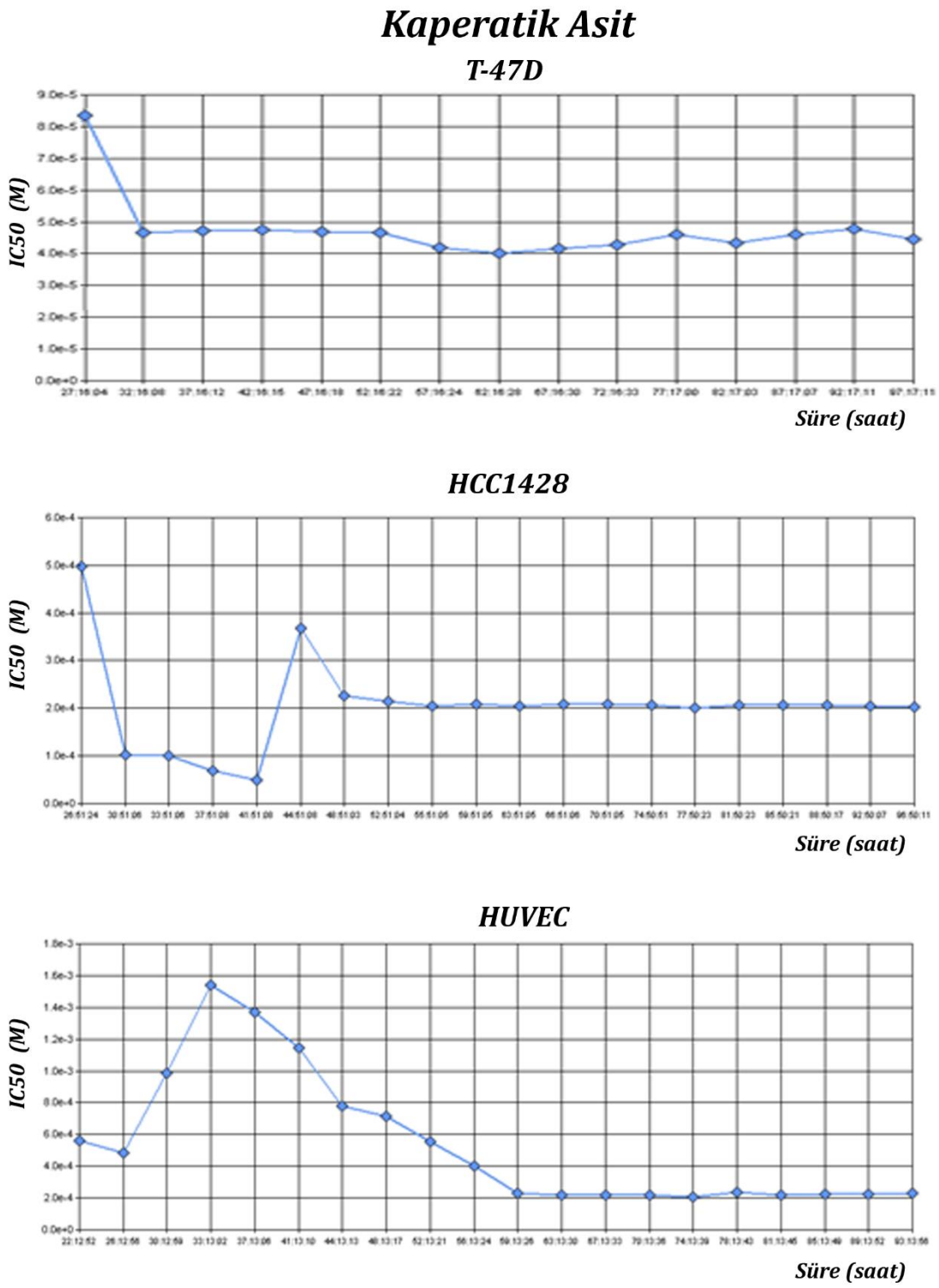
Normalleştirilmiş Hücre İndeksi Kullanılarak Belirlenen IC50 Değerleri (µM)			
Kaperatik Asit			
	T-47D	**HCC1428**	**HUVEC**
24 Saat	193,09	225,58	745,27
48 Saat	121,51	207,46	213,37
72 Saat	46,56	203,29	227,90



Şekil 3.10. *Kaperatik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi*



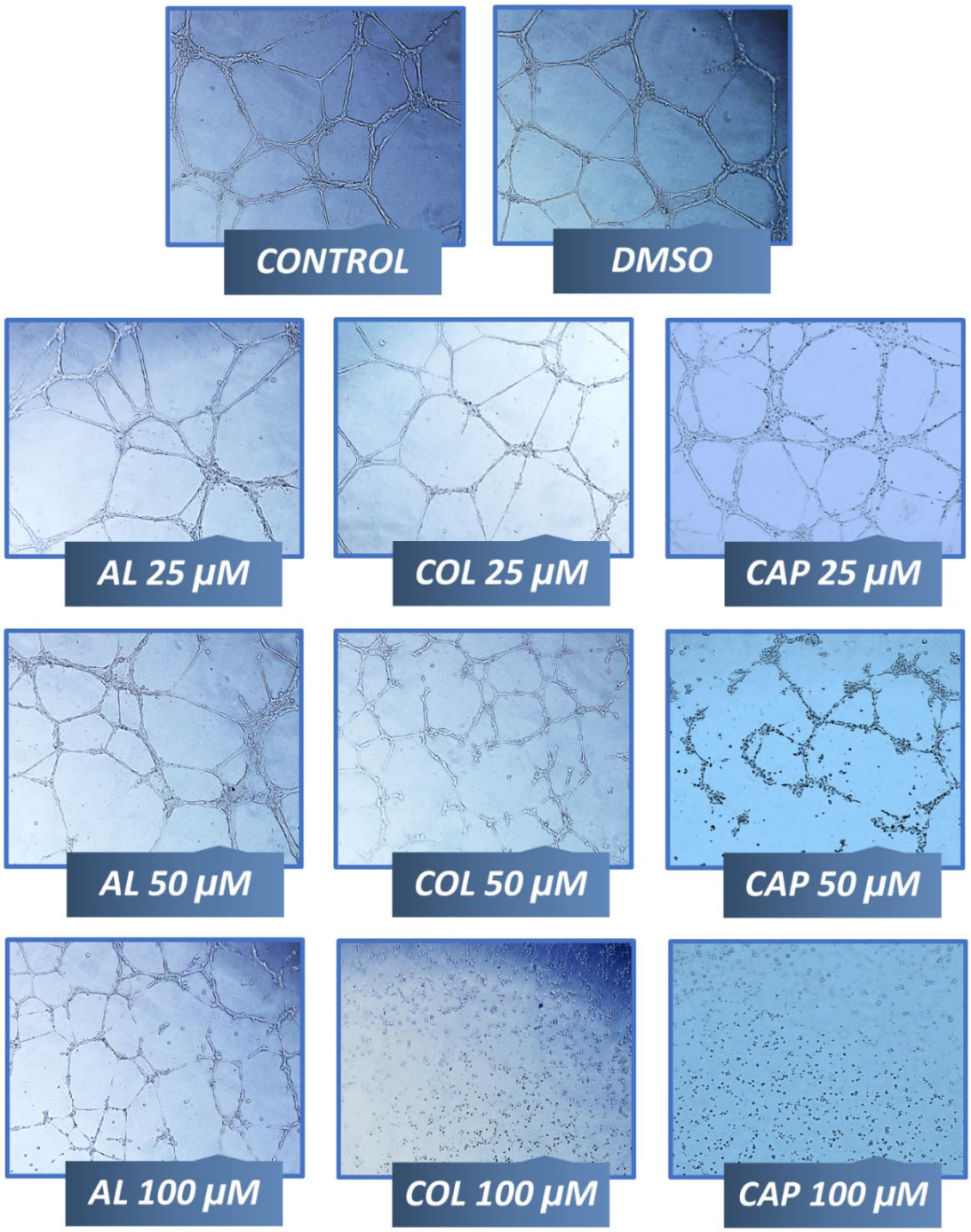
Şekil 3.11. *Kaperatik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, , HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenen konsantrasyon-normalleştirilmiş hücre indeksi bağımlı IC_{50} eğrileri*



Şekil 3.12. *Kaperatik asit bileşiğinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin geçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak belirlenmesi sonucu elde edilen, zamana bağlı IC_{50} eğrileri*

3.3. Endotel Hücre Tüp Formasyon Testi Sonuçları

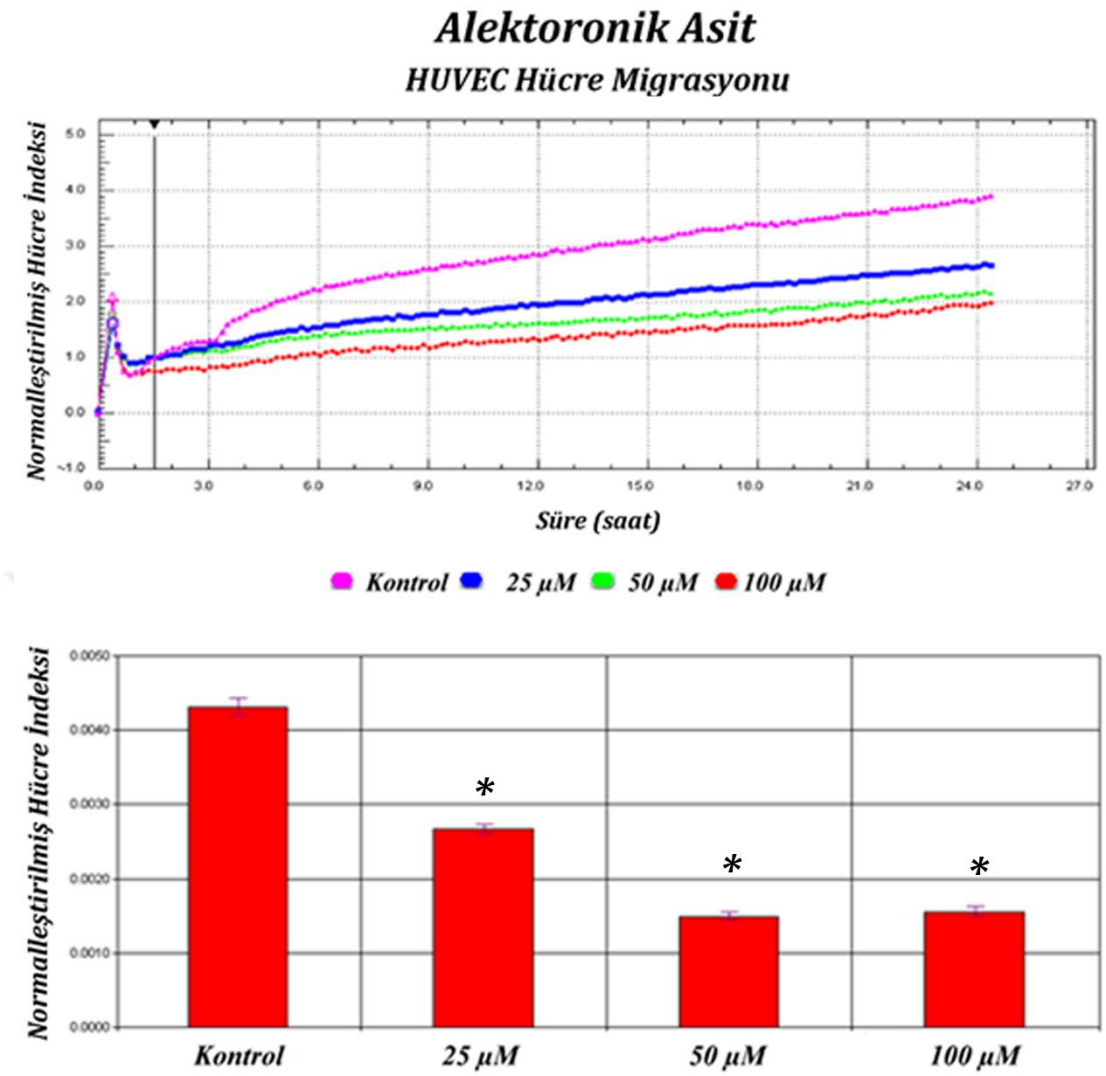
Likenlerden izole edilen küçük molekül yapılı alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin 25-50 ve 100 µM gibi toksik olmayan konsantrasyonlarının anti-anjiyojenik aktiviteleri *in vitro* endotelyal tüp formasyon testi kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.13). Elde edilen verilere göre; tüm liken asitleri konsantrasyona bağlı olarak endotel hücrelerinin tüp benzeri yapıları oluşturmalarını baskılamışlardır. Aktiviteleri belirlenen liken bileşiklerinden kaperatik asidin HUVEC endotel hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesinin diğer liken bileşiklerine göre daha düşük olmasına rağmen, daha kuvvetli bir anti-anjiyojenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, kollatolik asit ve alektoronik asit bileşiklerinin kimyasal yapıları birbirine benzerlik göstermesine rağmen, kollatolik asidin; toksisite testlerine paralel olarak, daha fazla anti-anjiyojenik aktivite sergilediği gözlemlenmiştir (Şekil 3.13).



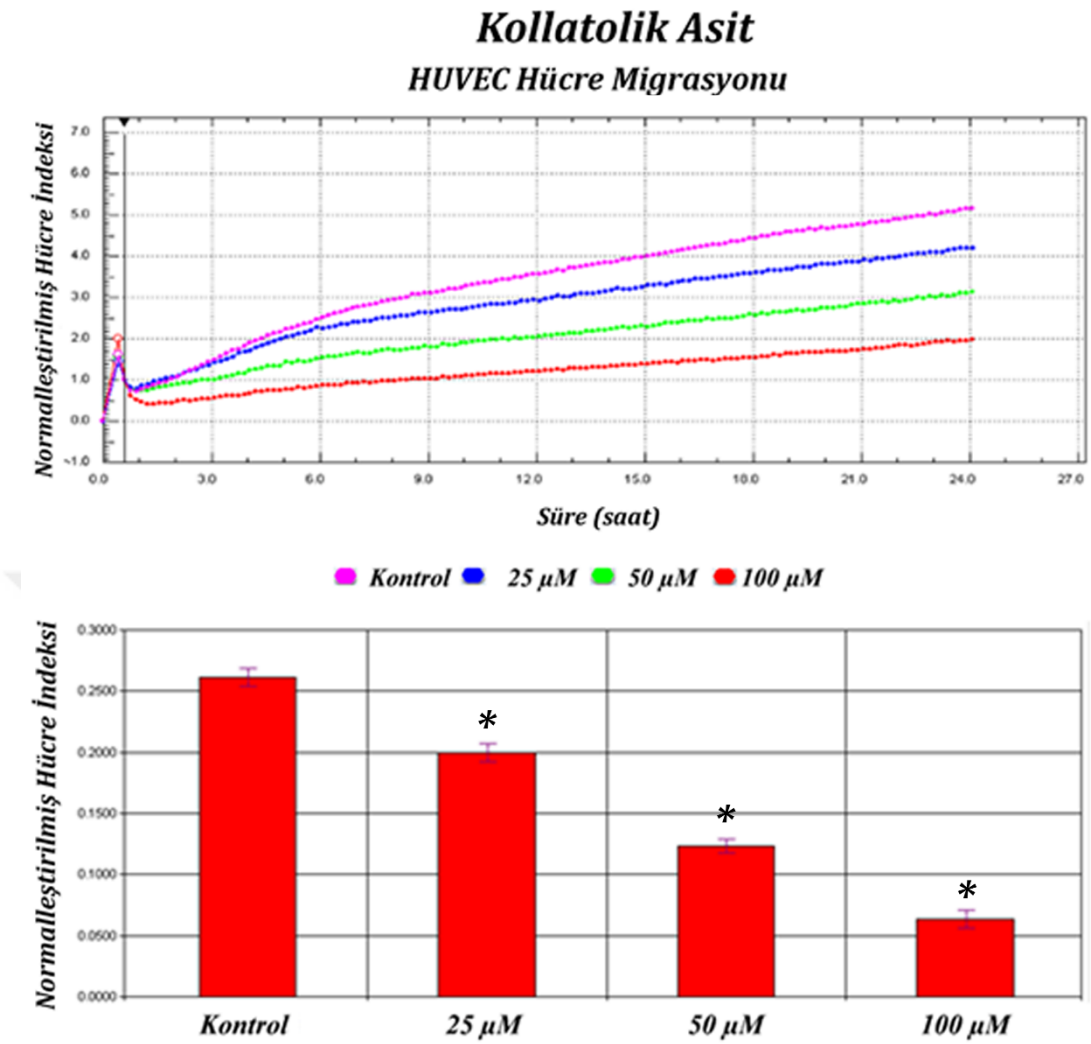
Şekil 3.13. *Likenlerden izole edilen küçük molekül yapılı bileşiklerin toksik olmayan konsantrasyonlarının anti-anjiyojenik aktivitelerinin HUVEC endotelyal tüp formasyon testi ile belirlenmesi. Alektoronik asit (AL), Kollatolik asit (COL), Kaperatik asit (CAP). Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.*

3.4. Liken Bileşiklerinin Endotel Hücre Göçü Üzerine Etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Belirlenmesi

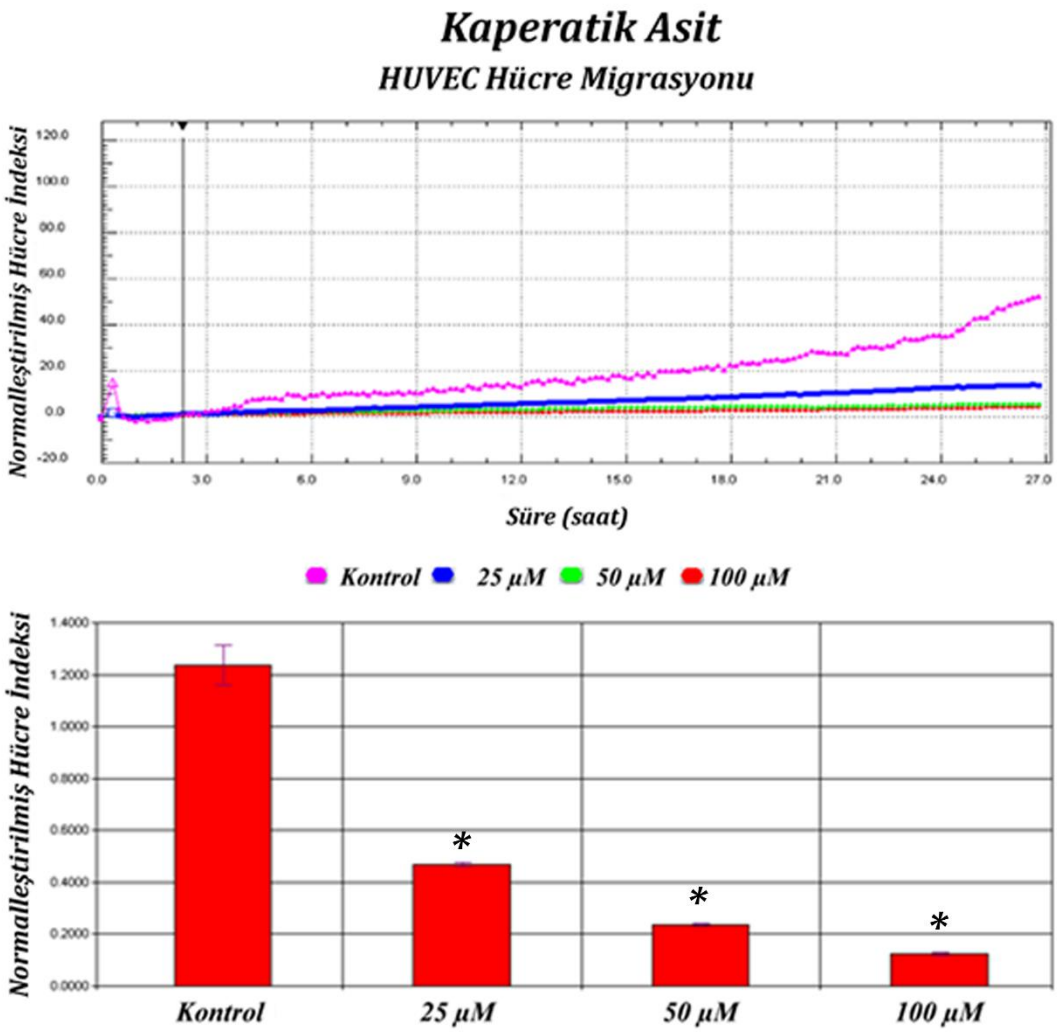
Bilindiği üzere, anjiyojenezin gerçekleşmesi için gerekli olan temel mekanizmalardan biri de endotel hücrelerinin migrasyonudur. Bu nedenle, likenlerden izole edilen alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin sitotoksik olmayan; 25-50 ve 100 µM konsantrasyonlarının, endotel hücrelerin göçü üzerine aktiviteleri, 24 saat süresince her 60 dakikada bir olmak üzere, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak incelenmiştir. Likenlerden izole edilen bileşiklerin; endotel hücre tüp formasyon testlerine paralel olarak konsantrasyona bağlı bir şekilde endotel hücrelerin migrasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15 ve Şekil 3.16). Alektoronik asit bileşiğinin migrasyon üzerine olan baskılayıcı aktivitesi ilk 3 saat içinde belirgin bir şekilde gözlenirken, kaperatik asidin 25 µM konsantrasyonunun anti-migrasyon aktivitesi ancak 6. saat sonunda belirgin bir şekilde ayırt edilebilmektedir (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Kaperatik asit bileşiğinin, endotel hücre migrasyonu üzerine aktivitesi incelendiğinde ise konsantrasyona bağlı olarak anti-migrasyon aktivitesinde keskin bir artış olduğu ve endotel hücre formasyon testlerine paralel olarak HUVEC hücrelerinin migrasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.13 ve Şekil 3.16).



Şekil 3.14. *Alektoronik asit bileşiğinin; HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak belirlenen zamana ve konsantrasyona bağlı değişim grafikleri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*



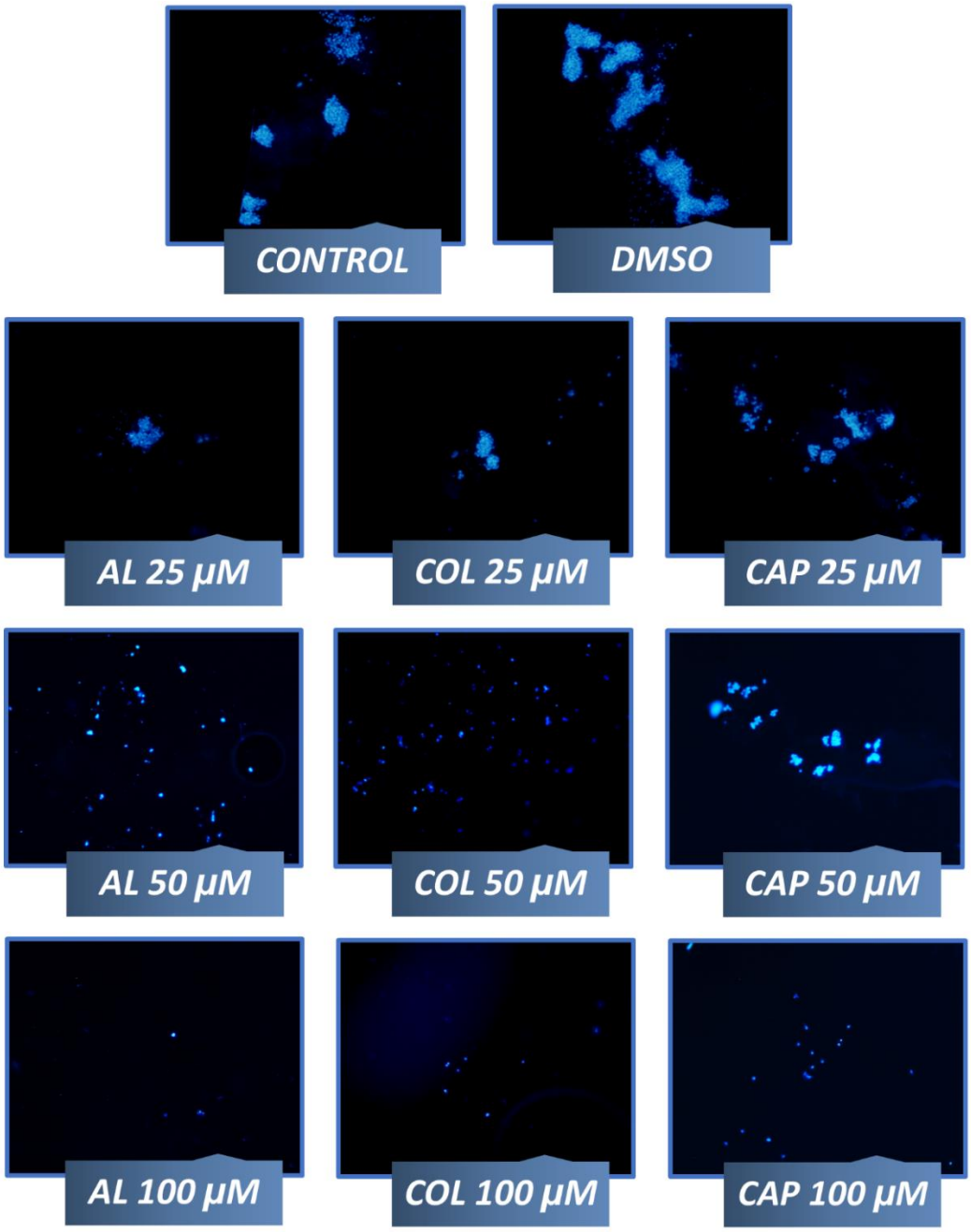
Şekil 3.15. *Kollatolik asit bileşiğinin; HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak belirlenen zamana ve konsantrasyona bağlı değişim grafikleri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*



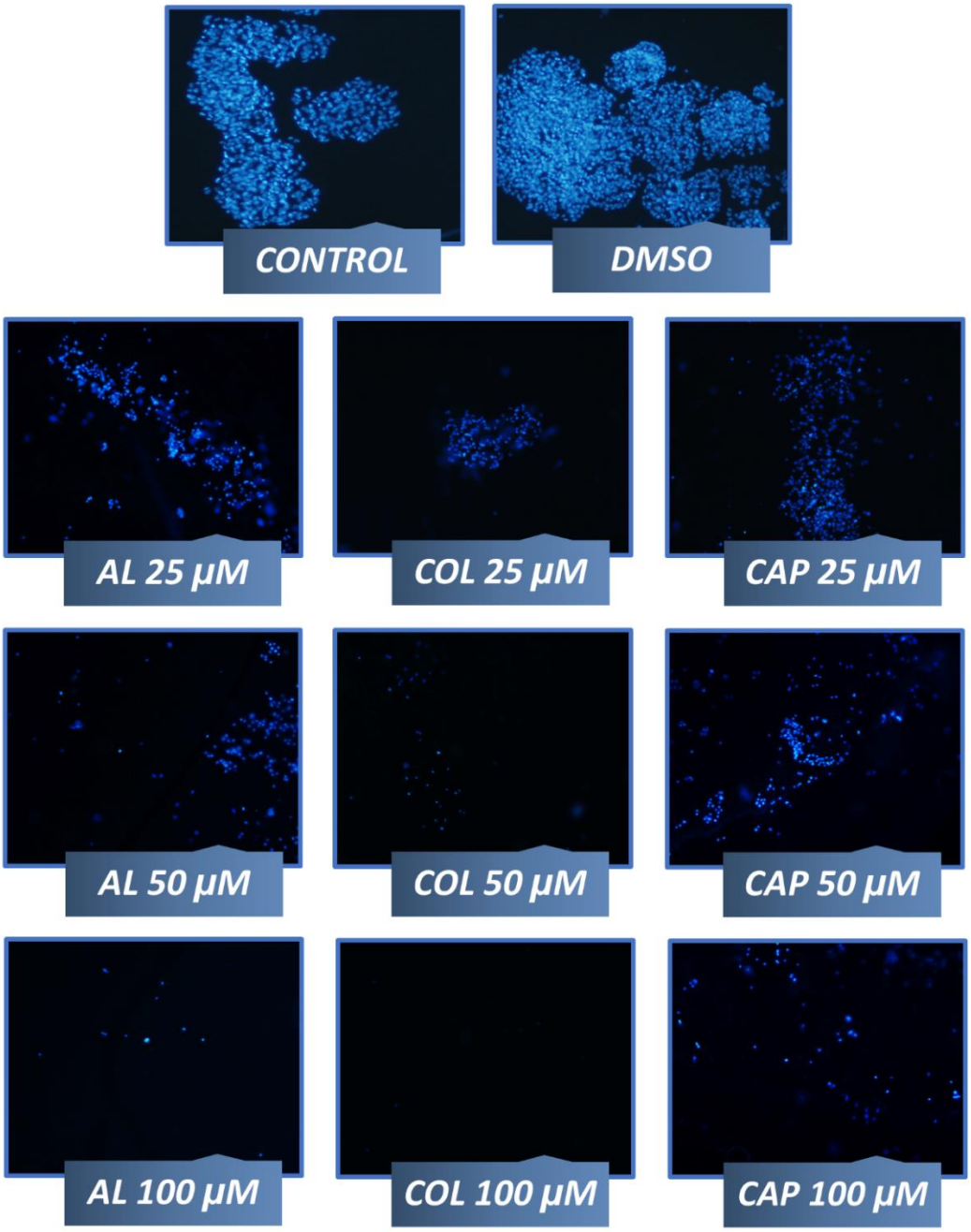
Şekil 3.16. *Kaperatik asit bileşiğinin; HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak belirlenen zamana ve konsantrasyona bağlı değişim grafikleri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*

3.5. Liken Bileşiklerinin Tümör Hücrelerinin Yayılımı (İnvazyonu) Üzerine Aktiviteleri

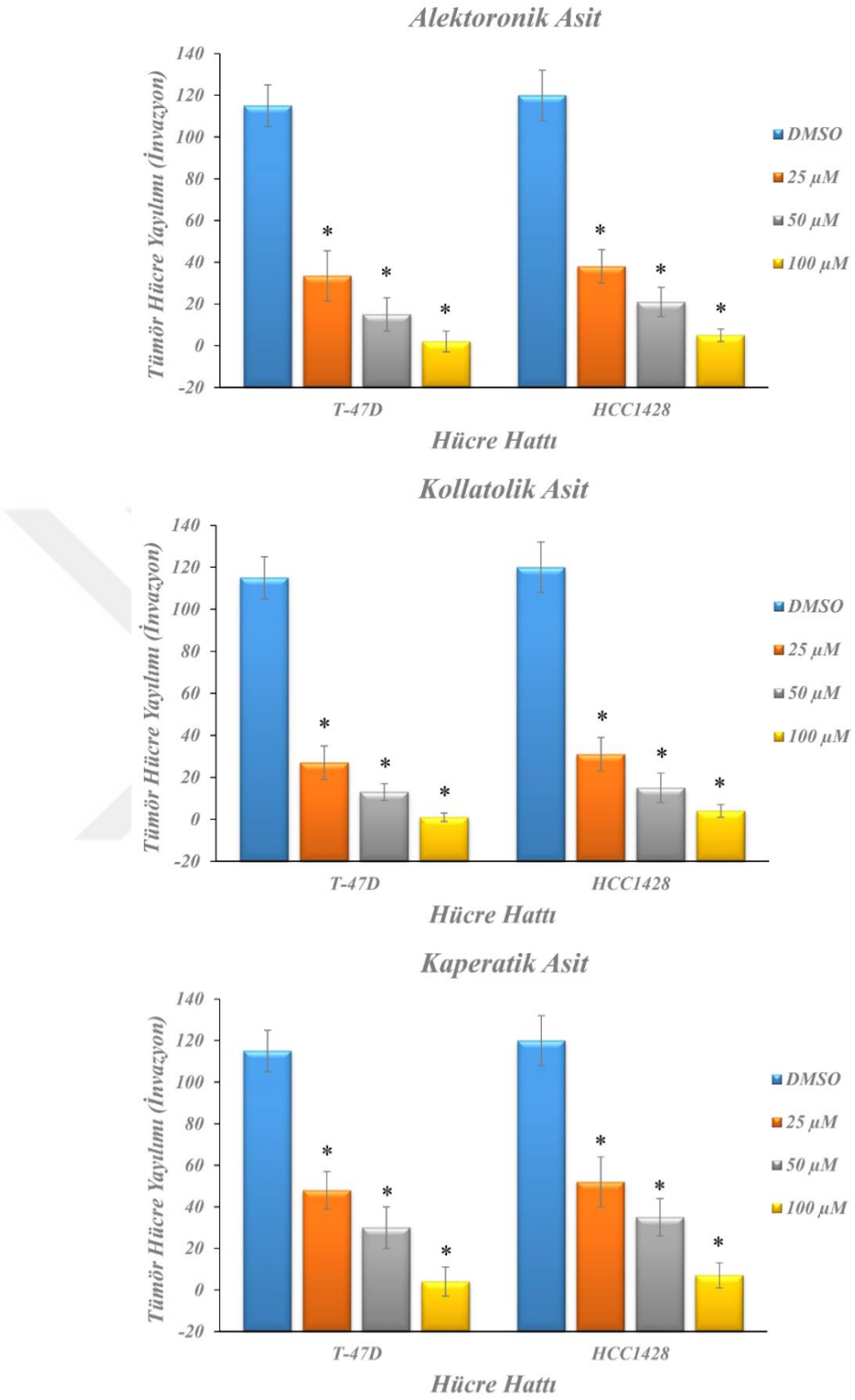
Kanser olgularının tedavisine ve gelişimlerinin baskılanmasına yönelik olarak gerçekleştirilen, anti-anjiyojenik özellikteki bileşiklerin keşfi çalışmalarında, etken bileşiklerin anjiyojenez ve endotel hücre migrasyonu üzerine olan aktiviteleri kadar tümör hücrelerinin invazyonu üzerine olan aktiviteleri de büyük önem arz etmektedir (Bölüm 1.4.3). Bu nedenle, likenlerden izole edilen alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin T-47D meme epitelyum duktal karsinoma ve HCC1428 meme epitelyum adenokarsinoma hücrelerinin invazyon yetenekleri üzerine olan aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen verilere göre; metastatik özelliğe sahip olan HCC1428 hücrelerinin T-47D hücrelerine göre daha yüksek invazyon yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.17 ve Şekil 3.18). Alektoronik asidin, T-47D ve HCC1428 hücrelerinin invazyonu üzerine aktiviteleri incelendiğinde, konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin invazyon yeteneğinin baskılandığı belirlenmiş ve uygulanan en düşük konsantrasyon olan 25 μM'ın dahi yaklaşık olarak %65 oranında kanser hücrelerinin invazyonunu engellediği belirlenmiştir (Şekil 3.19). Bununla birlikte; kollatolik asidin, alektoronik asit bileşiğine göre daha etkili olduğu; ancak kaperatik asidin daha az aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19).



Şekil 3.17. *Liken bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarının; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma hücrelerinin yayılımı (invazyonu) üzerine etkilerinin belirlenmesi. Alektoronik asit (AL), Kollatolik asit (COL), Kaperatik asit (CAP). Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.*



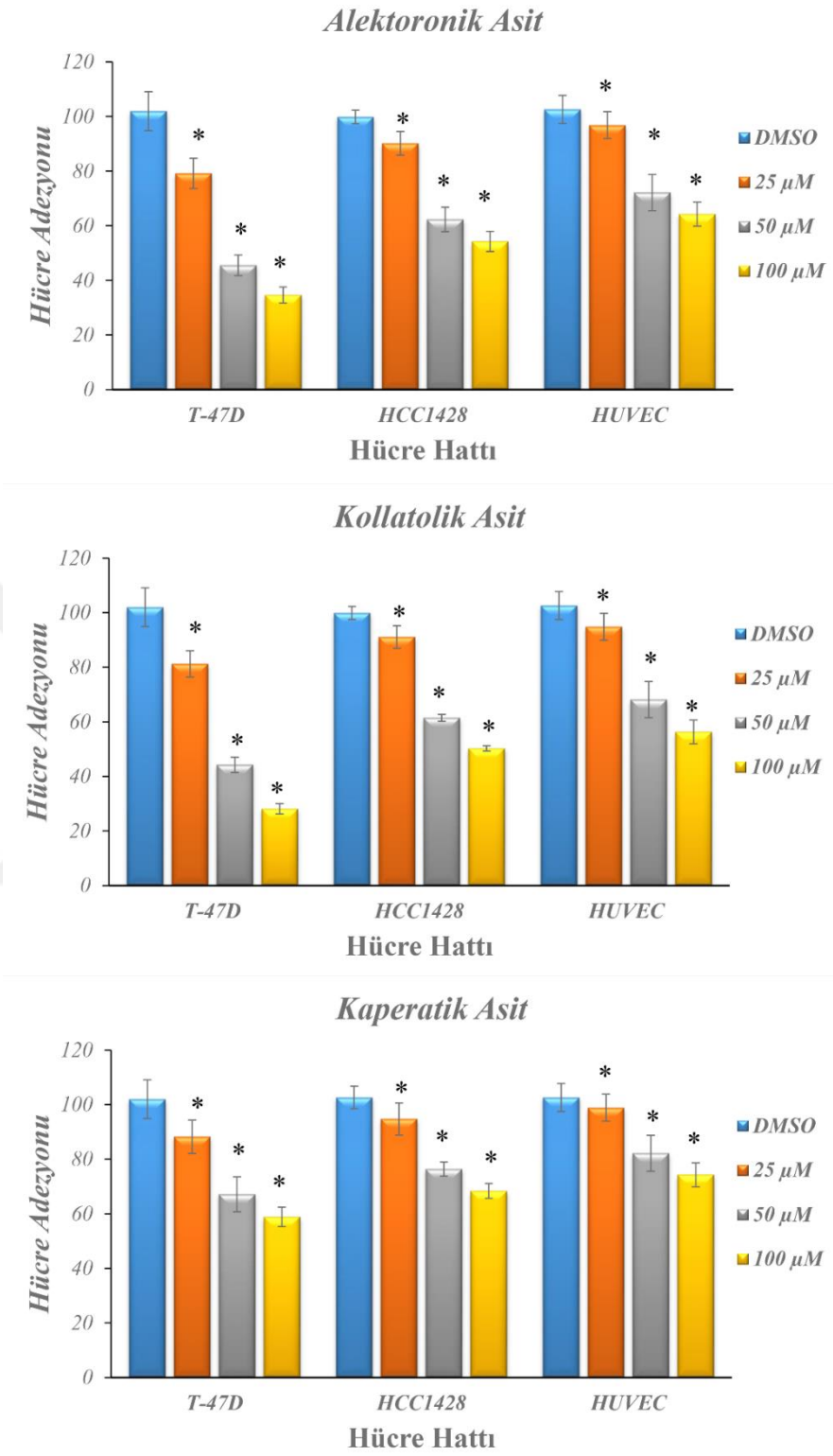
Şekil 3.18. *Liken bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarının; HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma hücrelerinin yayılımı (invazyonu) üzerine etkilerinin belirlenmesi. Alektoronik asit (AL), Kollatolik asit (COL), Kaperatik asit (CAP). Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.*



Şekil 3.19. *Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma ve HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma hücrelerinin yayılımı (invazyonu) üzerine etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*

3.6. Liken Bileşiklerinin Hücrelerin Adezyon Yeteneği Üzerine Aktiviteleri

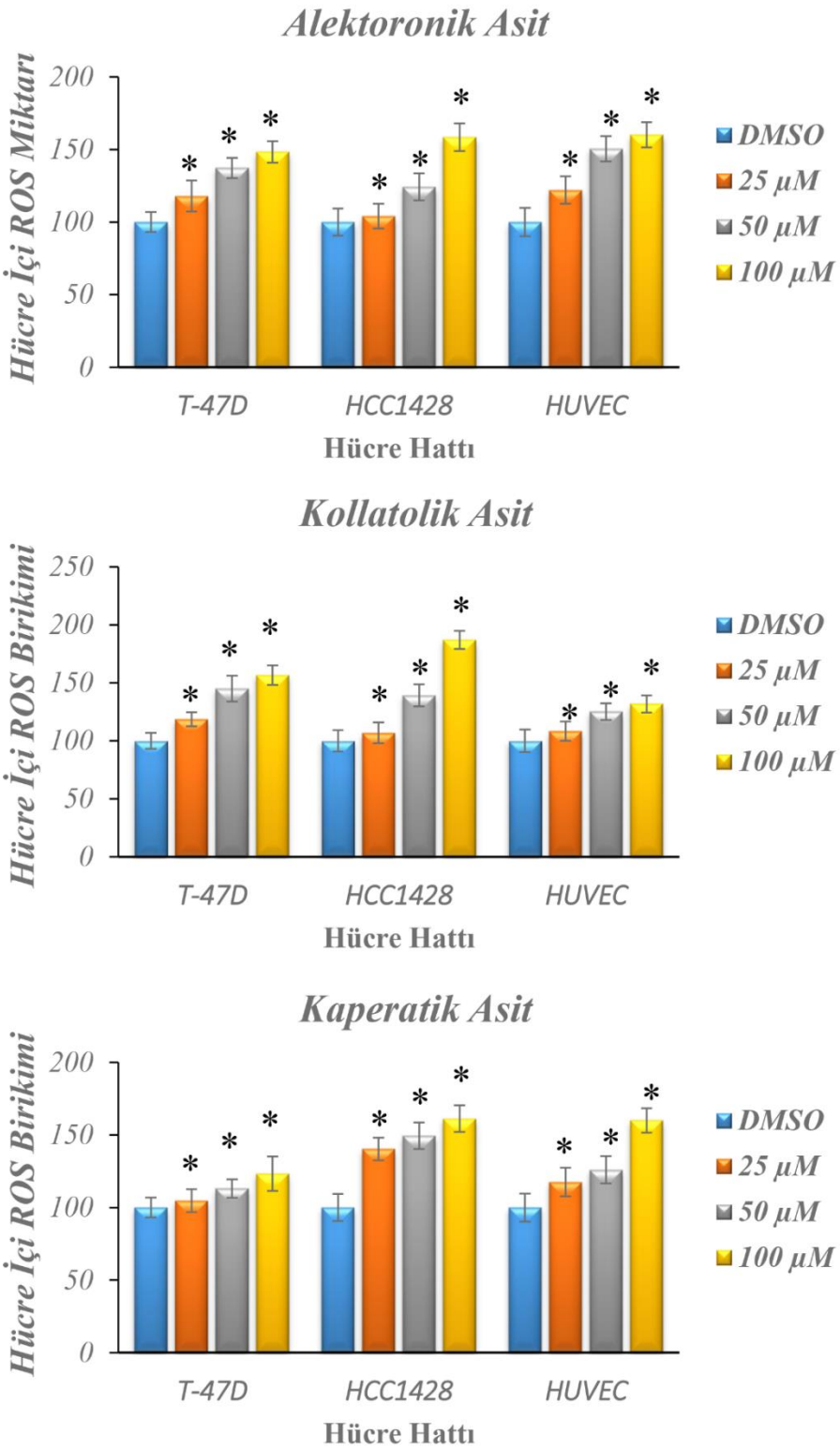
Bilindiği üzere, hücre adezyonu hem anjiyojenez hem de metastaz olgularının gerçekleşmesi sürecinde önemli bir aşama olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, likenlerden izole edilen alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücrelerinin adezyonu üzerine aktiviteleri 25-50 ve 100 μM konsantrasyonları kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen verilere göre; liken bileşiklerinin en fazla T-47D hücrelerinin adezyon yeteneği üzerine etkili olduğu, en az ise HUVEC hücrelerinin adezyon yeteneği üzerine etkili oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.20). Liken bileşikleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise kaperatik asit bileşiğinin adezyon yeteneği üzerine en az etkili bileşik olduğu, kollatolik asidin ise en etkili bileşik olduğu belirlenmiştir ki, elde edilen veriler toksisite testlerine ve diğer testlere paraleldir.



Şekil 3.20. *Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin adezyonu üzerine etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*

3.7. Liken Bileşiklerinin Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Birikimi Üzerine Etkileri

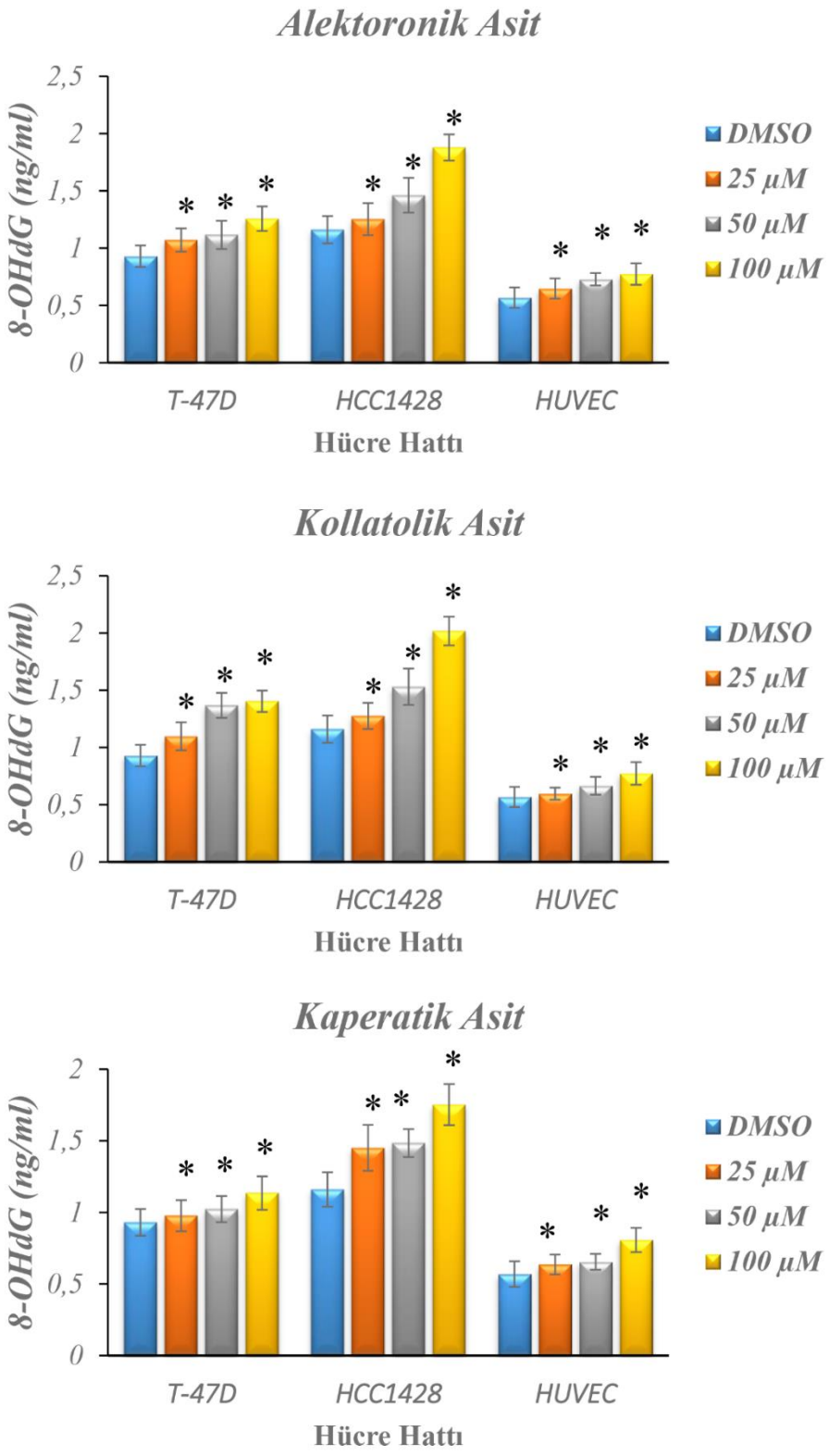
Reaktif oksijen türlerinin; kanser hücrelerinin gelişimi, büyümesi, invazyonu, metastazı ve tümör anjiyojenezi gibi olguların tetiklenmesinde önemli rollere sahip olduğu daha önceki bölümlerde ifade edilmiştir (Bölüm 1.3). Bu nedenle, likenlerden izole edilen alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin hücrelerde üretilen reaktif oksijen türlerinin miktarı üzerine etkileri DCFH-DA [2', 7'-Diklorodihidrofloresin diasetat] molekülü kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.21). Test bileşiklerinin T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktiviteleri incelendiğinde; test bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarına 24 saat süreyle maruz bırakılan hücrelerde, konsantrasyona bağlı olarak ROS miktarında bir artış oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 3.21). Test bileşikleri kendi arasında değerlendirildiğinde ise kaperatik asidin ROS üzerine aktivitesinin diğer bileşiklere göre daha az olduğu ve alektoronik asit ile kollatolik asidin birbirine yakın etki gösterdiği anlaşılmaktadır (Şekil 3.21). Test bileşiklerinin HCC1428 insan meme epitelyum 4. evre adenokarsinoma hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktivitelerine bakıldığında ise kollatolik asidin alektoronik asitten daha fazla ROS birikimine neden olduğu ve kaperatik asidin HCC1428 hücrelerinde T-47D hücrelerine göre daha fazla ROS birikimine neden olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 3.21). HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine yapılan testler sonucunda ise, T-47D ve HCC1428 hücrelerinden elde edilen verilerden farklı olarak, kollatolik asidin HUVEC hücrelerinde ROS birikimi üzerine en az etkili bileşik olduğu ve şaşırtıcı şekilde kaperatik asidin en etkili bileşik olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. *Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktiviteleri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*

3.8. Liken Bileşiklerinin Oksidatif DNA Hasarı Üzerine Aktivitelerinin 8-hidroksideoksiguanozine (8-OHdG) Eliza Testi Kullanılarak Belirlenmesi

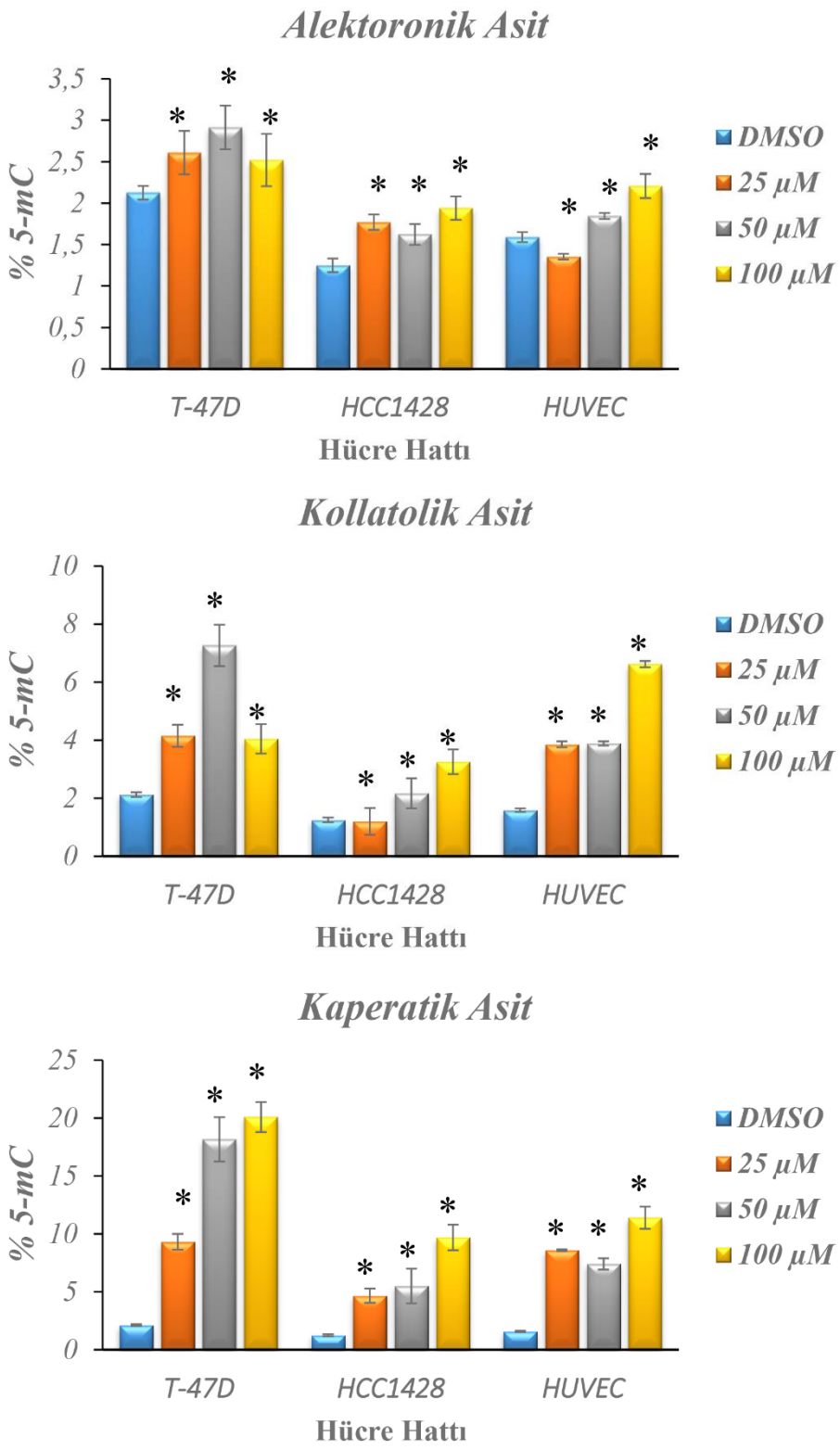
Bilindiği üzere hücre içinde oluşan reaktif oksijen türlerinin birincil hedeflerinden biri de DNA materyalidir. 8- hidroksideoksiguanozine (8-OHdG) ise hücrelerde maruz kaldığı oksidatif stresin ve karsinogenezin önemli belirteci olarak kabul görmektedir (Bölüm 2.13). Bu nedenle, likenlerden izole edilen bileşiklerin oksidatif DNA hasarı üzerine aktiviteleri 8-OHdG eliza testi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre; HCC1428 hücrelerinde daha fazla oksidatif DNA hasarı belirteci bulunduğu ve HUVEC hücrelerinde oksidatif DNA hasarı belirteci olan 8-OHdG miktarının en az seviyede olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.22). Likenlerden izole edilen bileşiklerinin oksidatif DNA hasarı oluşturma kapasiteleri incelendiğinde ise alektoronik ve kollatolik asit bileşiklerinin aktivitelerinin birbirine benzer olduğu; ancak kollatolik asidin daha fazla oksidatif DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.22). Bununla birlikte, reaktif oksijen türleri oluşturucu etkilerine paralel olarak, kaperatik asit bileşiğinin oksidatif DNA hasarı oluşturucu etkisinin en az düzeyde olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. *Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinde oksidatif DNA hasarı oluşturma kapasiteleri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*

3.9. Liken Bileşiklerinin Hücrelerin Epigenetik Özellikleri Üzerine Aktivitelerin Belirlenmesi

Tümör anjiyojenezi, metastazı, invazyonu ve gelişimiyle ilgili hücre içi ve hücreler arası mekanizmaların işleyebilmesi için hücre içinde birçok epigenetik değişimin meydana geldiği bilinmektedir (Bölüm 2.14). DNA metilasyonu ise hücrelerde meydana gelen epigenetik değişimlerden biri olarak karşımıza çıkmakta ve DNA üzerinde bulunan 5'-metilsitozin (5-mC) miktarının ölçülebilir olması nedeniyle, deneysel olarak tespit edilebilmektedir. Bu nedenle, doktora tezi kapsamında likenlerden izole edilen bileşiklerin; T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücrelerinin epigenetik yapıları üzerine etkileri DNA metilasyon kiti kullanılarak 100 ng DNA üzerindeki 5-mC bölgelerinin yüzde (%) olarak tespit edilebilmesi sayesinde incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda; T-47D hücrelerinden elde edilen DNA'nın metilasyon oranının diğer hücrelerden elde edilen DNA'lara göre daha fazla olduğu (~%2,13) belirlenmiş, HCC1428 hücrelerinden elde edilen DNA'nın ise en düşük seviyede (~%1,25) metilasyon oranına sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.23). Alektoronik asidin, hücrelerin DNA metilasyon oranı üzerine aktivitesi incelendiğinde; genellikle konsantrasyona bağlı olarak DNA metilasyon oranında bir artışa neden olduğu; ancak 100 μM konsantrasyonunun T-47D hücreleri üzerine olan etkinliğinde, 50 μM konsantrasyonuna göre belirgin bir düşüş olduğu görülmektedir. Kollatolik asidin aktivitesi incelendiğinde ise alektoronik aside göre daha etkili olduğu; ancak alektoronik asidin 100 μM konsantrasyonunda gözlemlenen aktivite düşüşüne benzer bir şekilde, kollatolik asidin de 100 μM konsantrasyonunun, T-47D hücrelerinin DNA metilasyon oranı üzerindeki etkisinin, 50 μM konsantrasyonuna göre daha düşük olduğu gözlenmektedir. İlginç bir şekilde, kaperatik asit bileşiği hücrelerin DNA metilasyon oranı üzerine en etkili bileşik olarak karşımıza çıkmış ve T-47D hücrelerinin DNA metilasyon oranı üzerine diğer hücrelerinkinden daha fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. *Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme epitelyum 4.evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücrelerinin DNA metilasyon oranları üzerine aktiviteleri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05.*

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antik Mısır ve Yunan uygarlıklarından günümüze değin, doğal kaynaklardan elde edilen; ekstrakt, infüzyon, kür, şurup, merhem ve çeşitli bileşikler hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve asırlara dayanan bilgi birikimi katlanarak artmaktadır (Solecki 1975, Saad vd. 2005, Ehrenreich 2010, Ghorbani 2014). 2013 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA); 1453 tane kimyasal maddenin kullanımını onaylamıştır, onaylanan bu maddelerin %40 kadarı ise doğal bileşik veya doğal bileşiklerden ilham alınarak sentezlenmiş olan, yarı-sentetik, sentetik veya doğal bileşik taklitleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Demain 2014, Kinch vd. 2014, Katz ve Baltz 2016). Doğal bileşiklerin aktivitelerinin keşfi ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımına yönelik yapılan araştırmaların ve bu araştırmalara ayrılan araştırma bütçelerinin yüksek olması; sadece asırlara dayanan bilgi birikiminin getirilerine dayandırılamamakta, aynı zamanda konvansiyonel tedavi yöntemlerinde karşılaşılan başarısızlıklarla da ilgili bulunmaktadır ki yapılan anket taramalarında doktor ve kanser hastalarının; radyoterapi, kemoterapi ve konvansiyonel tedavilerin yerine veya destekleyici olarak, doğal kaynakların kullanıldığı alternatif tedavi yöntemlerine yöneldiği anlaşılmaktadır (Shapiro ve Recht 2001, Sharma ve Gupta 2015, V Simoben vd. 2015).

Likenler ise sahip oldukları kimyasal ve biyolojik yapıları nedeniyle özel organizmalar ve zengin birer doğal bileşik kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Varol 2013, Varol 2015). *Tephromela atra* ve *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale isimli liken türleri ile ilgili çalışmalar incelendiğinde; anti-bakteriyel aktiviteleri, biyo-indikatör olarak kullanılabilirlikleri ve genetik çeşitlilikleri dışında fazla çalışma yapıldığı gözlemlenmektedir (Gupta vd. 2007, Muggia vd. 2008, Maslać vd. 2016). Mikobiyont (fungus) ve fotobiyont (alg ve/veya siyanobakteri) ortaklardan oluşan, biyolojik olarak özel bir yere sahip olan, kompleks simbiyotik yapıları sayesinde ekstrem yaşam koşullarına adapte olabilmiş ve simbiyotik ortaklar arasında müşterek bir metabolizma geliştirmiş olan bu özel organizmalar; başka canlılar tarafından üretilemeyen, farklı biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip, 1000'den fazla, kendine özgü, küçük molekül yapılı doğal bileşik sentezleyebilmektedirler (Müller 2001, Boustie ve Grube 2005, Stocker-Wörgötter

2008, Molnár ve Farkas 2010, Nguyen vd. 2013, Varol 2013, Varol 2015). Likenler tarafından sentezlenen bu bileşiklerin; ultraviyole ışınlara karşı koruyucu, enzim baskılayıcı, anti-proliferasyon, anti-tümör, anti-viral, anti-mikrobiyal, anti-protozoal, anti-inflamatuar, anti-pretik, analjezik vb. birçok aktiviteleri üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmasına ve yayınlanmasına rağmen, kanser tedavisi ve engellenmesine yönelik bir yaklaşım olan anti-anjiyojenik tedavide kullanılabilirlikleri hakkında yapılan araştırmaların azlığı ise dikkat çekicidir (Koparal vd. 2010, Song vd. 2012, Shrestha ve Clair 2013, Kim vd. 2015, Koparal 2015, Varol 2015).

Bilindiği üzere, tümör hücrelerinin çoğalmaları ve gelişimlerini devam ettirebilmeleri, doku oluşturmaları, invaze olmaları ve metastaz yapabilme yeteneği kazanabilmeleri süreçlerinde, tümör anjiyojenezi büyük rol üstlenmekte ve tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmaları sırasında, mikro çevrede meydana gelen fizyoloji ve mekanik stres sonucunda anjiyojenez olgusu tetiklenmektedir (Weis ve Cheresh 2011). Tümör anjiyojenezi sonrasında, yeni oluşan kılcal damarların yapısal ve fonksiyonel bozukluklara sahip olması nedeniyle oluşan, doku perfüzyonundaki aksaklıklar ise döngüsel hipoksi gibi yeni problemlerin meydana gelmesine ve mikro çevredeki stres faktörlerinin, tümör anjiyojenezinden öncesine göre, kat ve kat daha fazla olmasına yol açmaktadır (Scherz-Shouval ve Elazar 2007, Dewhirst vd. 2008, Rouschop vd. 2009, Koritzinsky ve Wouters 2013, Wang vd. 2015, Michiels vd. 2016). Bu nedenle, kanser olgularının tedavisinde ve gelişimlerinin engellenmesinde, anjiyojenez en önemli hedeflerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Carmeliet ve Jain 2000).

Likenlerden izole edilen bileşiklerin anjiyojenez üzerine aktiviteleri hakkında yapılan az sayıdaki çalışmada; *Pseudevernia furfuracea* (var. ceratea) isimli likenin aseton özütünden izole edilen bir tür depside olan olivetorik asidin (Koparal vd. 2010), ticari olarak temin edilmiş bir liken asidi olan usnik asidin (Song vd. 2012), *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd isimli likenden izole edilen (-)- usnik asidin (Koparal 2015), *Letharia vulpina* (L.) Hue isimli likenden izole edilen vulpinik asidin (Koparal 2015) ve likenlere özgü olmamasına rağmen likenler tarafından da sentezlenebilen emodin (Huang vd. 2005, Kwak vd. 2006, Shrimali vd. 2013) ile sekalonik asit-D'nin;

anti-anjiyojenik özelliklere sahip oldukları (Guru vd. 2015) ve genel olarak umut vaat edici oldukları belirlenmiştir (Varol 2015). Ayrıca, Song ve arkadaşları usnik asit bileşiğinin tümör gelişimi üzerine aktivitesini *in vivo* olarak da incelemiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre, tümör dokusunun çapı; usnik asit bileşiğinin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak azaltmaktadır. Tümör çapında meydana gelen bu azalmanın temel nedeni olarak ise tümör anjiyojenezinin baskılanmasının etkili olduğu düşünülmektedir (Song vd. 2012).

Tüm bu sebeplerden dolayı, gerçekleştirilen doktora tezi kapsamında; alektoronik asit ve kollatolik asit bileşikleri, *Tephromela atra* Fée isimli liken türünden, kaperatik asit bileşiği ise *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale isimli liken türünden izole edilerek anjiyojenez ve diğer bazı hücresel aktiviteler üzerine etkileri incelenmiştir (Şekil 2.1).

Likenlerden izole edilen test bileşiklerinin anjiyojenez üzerine aktiviteleri incelenmeden önce, bu bileşiklerin; T-47D insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma, HCC1428 insan meme bezi epitelyum IV. evre adenokarsinoma ve HUVEC insan göbek bağı damar endotel hücreleri olmak üzere, farklı tipteki hücreler üzerine sitotoksik aktiviteleri, ucuz ve kolay bir yöntem olarak kabul edilen MTT hücre canlılığı test yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Gerlier ve Thomasset 1986). Bu liken bileşiklerinin sitotoksik aktiviteleri ilk kez, bu tez çalışması kapsamında, incelenmiştir. Elde edilen verilere göre; kollatolik asidin en etkili, kaperatik asidin ise en az aktiviteye sahip liken bileşiği olduğu belirlenmiştir (Bölüm 3.1). Bununla birlikte, test bileşiklerinin IC_{50} değerlerinin, tüm hücre tipleri için, 100 µM konsantrasyon daha yüksek olduğu ve HUVEC hücreleri üzerine olan aktivitelerinin diğer hücreler üzerine olan sitotoksik aktivitelerinden daha az olduğu belirlenmiştir (Bölüm 3.1).

Likenlerden izole edilen alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerin; zamana bağlı sitotoksik aktivitelerinin daha detaylı incelenebilmesi için gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA MP) kullanılarak toksisite testleri yapılmıştır (Bölüm 3.5). RTCA MP sistemi kullanılarak gerçekleştirilen toksisite testlerinde elde edilen grafikler incelendiğinde; diğer toksisite testlerine paralel

olarak, en etkili test bileşiğinin kollatolik asit ve en zayıf aktiviteye sahip bileşiğin ise kaperatik asit olduğu gözlemlenmektedir; ancak kaperatik asidin T-47D hücreleri üzerine aktivitesi sonucu elde edilen, hücre indeksine bağlı olarak hesaplanan IC_{50} değerleri incelendiğinde, sanki kaperatik asit bileşiği diğer test bileşiklerine göre daha yüksek aktiviteye sahipmiş gibi görünmektedir (24 saat için hesaplanan IC_{50}=50,81 µM). Burada, cihazın yazılımı tarafından, hücre indeksine bağlı olarak hesaplanan IC50 değerlerinin; kaperatik asidin T-47D hücreleri üzerine uygulanan konsantrasyonlarının (25-50-100-200 ve 400 µM) sitotoksik aktivitelerinin birbirine yakın olması nedeniyle, hatalı hesaplandığı görülmektedir. Çünkü kaperatik asit için cihazın yazılımı tarafından; normalleştirilmiş hücre indeksine bağlı olarak hesaplanan IC_{50} değerleri, diğer testler sonucunda elde edilen verilere daha çok benzerlik göstermektedir (Tablo 3.3). Elde edilen veriler toplu olarak değerlendirildiğinde; MTT hücre canlılığı testleri sonucunda düşük toksisiteye sahip olduğu belirlenen kaperatik asit; RTCA MP sisteminde gerçekleştirilen testler sonucunda yüksek toksisiteye sahipmiş gibi görünmektedir. RTCA MP sisteminin; plaka zemine yapışan hücreler tarafından oluşturulan fokal adezyon komplekslerinin neden olduğu elektriksel empedansı ölçtüğü ve bu empedansın da hücre proliferasyonu, hücre morfolojisinde meydana gelen değişimler ve hücrelerin adezyon kapasiteleri gibi özelliklere bağlı olduğu bilinmektedir (Ke vd. 2011). Hücrelerin ise çevresel değişimlere bağlı olarak, geniş alan kaplayan rijit yapılarını kaybettikleri ve daha yumuşak hatlara sahip yapılar kazandıkları, yani fokal adezyon komplekslerinde azalma meydana geldiği bilinmektedir (Geiger vd. 2009). Bu nedenle, RTCA MP sistemi kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde elde edilen sonuçlarda gözlemlenen farklılığın; kaperatik asidin yüksek toksisiteye sahip olmasından değil, hücrelerde oluşturduğu stres sonucunda fokal adezyon komplekslerinde meydana gelen azalma ve rijit yapı kaybına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu tarz durumlar, RTCA MP sistemine uygun olarak tasarlanmış ve mikroskop altında da gözlemlenebilme özelliğine sahip olan plakaların (E-Plate VIEW 96; Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kullanımıyla fotoğraflanması ve kanıtlanması mümkündür; ancak bu plakalar standart 96 kuyucuklu plakalara (E-Plate 96) göre daha yüksek maliyete sahiptir ve her bir görüntüleme için RTCA sisteminin durdurularak, görüntüleme sonrası

devam ettirilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte; hücrelerin plaka zeminlerine tutunma yeteneklerinin, zeminin sertliğine ve kaplama materyalinin çeşidine bağlı olarak değişim gösterdiği unutulmamalıdır ki bu nedenle, RTCA MP sistemi sonuçları hücre adezyon testlerine ait verilerle bağlantılı olarak yorumlanmamıştır (Deligianni vd. 2000). Sonuç olarak, gerçek zamanlı hücre analiz sistemleriyle gerçekleştirilen proliferasyon deneyleri birçok avantaja sahip ve güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmesine rağmen, tek başına yeterli olmadığı ve diğer toksisite testlerinden bir veya birkaçı kullanılarak, elde edilen verilerin desteklenmesi gerektiği belirlenmiştir (Ke vd. 2011, Moniri vd. 2015)

Likenlerden izole edilen alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin toksisite testleri sonucunda elde edilen verilere göre belirlenen IC_{50} değerlerinin altında yer alan; 25-50 ve 100 µM konsantrasyonları, diğer testlerde kullanılmak üzere seçilmiş ve toksik olmayan veya düşük toksisiteye sahip olan bu konsantrasyonların; anjiyojenez, adezyon, invazyon, ROS birikimi, oksidatif DNA hasarı oluşumu ve DNA metilasyonu gibi olgular üzerine aktiviteleri incelenmiştir.

Endotel hücreleri serum açlığına bırakıldığında damar oluşumuna yönelik olarak tüp formları meydana getirmekte ve endotel hücrelerin bu özellikleri *in vitro* anjiyojenez çalışmalarına bir model ve temel oluşturmaktadır (Ponce 2009, Koparal vd. 2010). Doktora tez çalışması kapsamında da, likenlerden elde edilen bileşiklerin 25-50 ve 100 µM konsantrasyonlarının anti-anjiyojenik aktiviteleri *in vitro* matrijel tüp formasyon testi kullanılarak incelenmiştir (Bölüm 3.6). Günümüzde, kemoterapide kullanılan etken bileşiklerin kanserli hücreler kadar sağlıklı hücreler üzerine de zarar verdiği bilinmektedir (Koparal 2015). Elde edilen verilere göre, kaperatik asidin en düşük toksisiteye sahip olmasına rağmen, en yüksek anti-anjiyojenik aktiviteyi gösterdiği, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda HUVEC hücrelerinin tüp formu oluşturmasını engellediği ve hücre morfolojilerinde de bozulmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Anti-anjiyojenik bileşiklerin keşfinde bu arzu edilen bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır (Koparal vd. 2010). Hücrelerin çoğalması baskılanmazken, tüp yapılarının oluşumu baskılanmıştır. Ayrıca, 25 µM konsantrasyonunda da, HUVEC hücrelerinin oluşturduğu tüp yapılarının kontrol grubuna göre daha ince olduğu ve lümen genişliklerinin büyük olduğu gözlenmiştir

(Şekil 3.13). Kollatolik asit ile alektoronik asit bileşiklerinin anjiyojenez üzerine aktiviteleri ise birbirine benzer olmakla birlikte, kollatolik asidin daha aktif olduğu belirlenmiştir. Koparal tarafından 2015 yılında yayınlanan çalışmada da, doktora tezi kapsamında kullanılan yöntem kullanılmış ve vulpinik asit bileşiğinin 150-300-600 µM konsantrasyonları ile (-)- usnik asit bileşiğinin 50-100-200 µM konsantrasyonlarının anti-anjiyojenik aktiviteleri incelenmiştir (Koparal 2015). Bu çalışma ile doktora tezi kapsamında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında; kaperatik asit bileşiğinin, (-)- usnik asit ve vulpinik asit bileşiklerine göre daha yüksek anti-anjiyojenik aktiviteye sahip olduğu, alektoronik asit ve kollatolik asit bileşiklerinin ise (-)- usnik asidin aktivitesine benzer bir aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmektedir (Koparal 2015). Koparal tarafından gerçekleştirilen çalışmada da, liken asitlerinin Hep G2 ve NS20Y hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitelerinin HUVEC hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitelerine göre daha yüksek olması ilginçtir. Ayrıca, Koparal ve ark. tarafından 2010 yılında yayınlanan ve olivetorik asidin; RATEC hücrelerinin tüp formu oluşturma yetenekleri üzerine aktivitelerinin incelendiği çalışmada da, olivetorik asidin 25-50-100 ve 200 µM konsantrasyonları uygulanmış ve tüm konsantrasyonların tüm formu oluşumunu bozduğu belirlenmiştir (Koparal vd. 2010).

Alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin anti-anjiyojenik aktiviteleri incelendikten sonra, bu bileşiklerin endotel hücre migrasyonu aktiviteleri; gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak araştırılmıştır (Bölüm 3.7). Elde edilen verilere göre; kaperatik asit bileşiğinin diğer bileşiklere göre, endotel hücre migrasyonunu daha çok baskıladığı ve en ez etkili bileşiğin alektoronik asit olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15 ve Şekil 3.16). Endotel hücre migrasyonu testlerinden elde edilen veriler ile tüp formasyon testleri sonucunda elde edilen verilerin birbiriyle uyumlu olması nedeniyle, test bileşiklerinin anti-anjiyojenik aktivitelerinin endotel hücre migrasyonunun baskılanması yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Wiley vd. 2011, Vanhollebeke vd. 2015, Betz vd. 2016, Ulrich vd. 2016). Liken bileşiklerinin endotel hücre adezyonu üzerine aktiviteleri incelendiğinde ise toksisite testlerine paralel bir aktivite gösterdikleri ve en az aktivite gösteren bileşiğin kaperatik asit, en çok aktivite gösteren bileşiğin ise kollatolik asit olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 3.20).

Bu bağlamda, anti-anjiyojenik ve anti-migrasyon aktiviteleri ile adezyon aktiviteleri arasında bir bağlantı bulunmasında ziyade; sitotoksik aktiviteleri ile anti-adezyon aktivitelerinin ve anti-migrasyon ile anti-anjiyojenik aktivitelerinin bağlantılı olduğu görülmektedir.

Tümör anjiyojenezi ve metastaz olguları birbirine benzer özelliklere sahip olan ve birbiriyle bağlantılı olgular olarak karşımıza çıkmaktadır (Wang vd. 2011, Kim ve Byzova 2014, Michiels vd. 2016). Bu nedenle, anti-anjiyojenik aktiviteye sahip olduğu tespit edilen liken bileşiklerinin, tümör hücresi invazyonu ve adezyonu üzerine aktiviteleri de incelenmiştir (Bölüm 3.8 ve Bölüm 3.9). Elde edilen verilere göre; HCC1428 hücrelerinin metastaz yeteneklerinin T-47D hücrelerinden daha fazla olması nedeniyle, daha yüksek invazyon yeteneği gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 3.17 ve Şekil 3.18) (Ahmadian vd. 1997, Gazdar vd. 1998, Sakai vd. 2008). Tümör hücresi invazyonu ve adezyonu üzerine aktiviteleri incelenen liken bileşiklerinin; konsantrasyona bağlı olarak aktivite gösterdikleri ve bu aktivitelerin toksisite testlerinde elde edilen sonuçlara paralel olduğu belirlenmiştir. Adezyon ve invazyon sonuçlarının birbirine uyumlu olması ise liken bileşiklerinin; tümör hücrelerinin invazyon yeteneklerini baskılama kapasitelerinin, hücrelerin adezyon yeteneklerinin azaltılması yoluyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Ayrıca, kaperatik asit bileşiğinin RTCA MP sistemi kullanılarak elde edilen toksisite testi sonuçları da bu bakış açısını destekler niteliktedir (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20). Sonuç olarak, tümör hücrelerinin invaze olmaları için zemine tutunmaları, matrijeli parçalamaları ve hareket etmeleri gerekmektedir (Chambers vd. 2002, Fidler 2003, Sahai 2007, Friedl ve Alexander 2011).

Gerek tümör anjiyojenezi, gerekse tümör metastazı süreçlerinde, hücre içinde oluşan reaktif oksijen türlerinin büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir (Hammond vd. 2003, Moeller vd. 2004, Kalliomäki vd. 2008, Toffoli ve Michiels 2008, Azad vd. 2009, Toffoli vd. 2009, Hsieh vd. 2010, Hsieh vd. 2012, Granger ve Kvietys 2015, Michiels vd. 2016). Bu nedenle, likenlerden izole edilen bileşiklerin; ROS birikimi üzerine aktiviteleri ve reaktif oksijen türlerinin hücre içi hedeflerinden biri olan DNA üzerine oluşturabilecekleri oksidatif hasarlar tespit edilmiştir (Bölüm 3.10 ve Bölüm 3.11). Test bileşiklerinin; ROS birikimi üzerine olan aktivitelerinin

toksisite testlerine paralel olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.21). Dolayısıyla, liken bileşiklerinin T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivite mekanizmalarından birinin ROS oluşturma kapasitelerine bağlı olduğu düşünülmüştür (Avalos vd. 2014). Oksidatif DNA hasarı belirleme testleri sonucunda elde edilen veriler de ROS birikimi aktivitelerine paraleldir ve hücrelerde meydana gelen oksidatif DNA hasarları hücrelerin apoptoza gitmelerine veya yaşamlarının son bulmasına neden olmaktadır (Cooke vd. 2003). Ayrıca, reaktif oksijen türlerinde olağan dışı artışların hücre iskeletinin yapısında değişimlere neden olduğu ve hücre migrasyonu, adezyonu gibi olguları etkilediği bilinmektedir (Ding vd. 2001). Bu nedenle, liken bileşiklerinin ROS arttırıcı aktiviteleri ile anti-anjiyojenik, anti-migrasyon, anti-adezyon ve tümör hücresi invazyonunu baskılayıcı aktivitelerinin bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Likenlerden elde edilen alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin tüm bu aktivitelerinin epigenetik bir kaynağının olup olmadığı ise DNA üzerinde bulunan 5'-metilsitozin (5-mC) miktarının ölçülmesi yoluyla DNA metilasyonunun belirlenmesi sonucu incelenmiştir (Bölüm 3.12). Bilindiği üzere; kanser gelişimi ve tümör hücrelerinin çoğalması, tümör anjiyojenezi ve invazyonu, hücre farklılaşması, hücre göçü ve proliferasyonu gibi birçok olgunun DNA metilasyonu ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Gama-Sosa vd. 1983, Gronbaek vd. 2007, Iacobuzio-Donahue 2009, Esteller 2011, Egger ve Arimondo 2015). Deneyler sonucunda elde edilen verilere göre; metastatik özellikteki HCC1428 hücrelerinin en düşük seviyede, T-47D hücrelerinin ise en yüksek seviyede DNA metilasyon oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.23). Bazı kanser hücrelerinde, tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu bölgelerin metilasyon yoluyla baskılandığı ve bu tip kanser hücrelerinde hipermetilasyon (fazla metilasyon) olgusunun gözlemlendiği belirlenmiştir ki, T-47D hücrelerinde gözlemlenen yüksek metilasyon oranının bu sebeple olduğu düşünülmektedir (Lujambio vd. 2008, Egger ve Arimondo 2015). Bazı tümör hücrelerinde ise DNA üzerinde sağlanan epigenetik dengenin kaybolduğu, DNA metilasyon oranın çok fazla düştüğü (hipometilasyon) ve aktive olmaması gereken gen bölgelerinin de aktive olduğu bilinmektedir ki, HCC1428 hücrelerinde gözlemlenen hipometilasyon durumunun sebebinin de bu olduğu düşünülmektedir (Van Zee vd. 1998). Liken bileşiklerinin ise genellikle

konsantrasyona bağlı olarak metilasyon oranında bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.23). Hücrelerin çoğalmadıkları, metabolik ve fizyolojik faaliyetlerinin azaldığı durumlarda, DNA metilasyonunda artış meydana geldiği, bu nedenle de farklılaşmış ve artık bölünmeyen hücrelerin DNA'sında metilasyon oranının daha yüksek olduğu bilinmektedir (Meissner vd. 2008, Beerman vd. 2013). Liken bileşiklerinin de; anti-migrasyon, anti-adezyon, anti-anjiyojenik ve anti-invazyon aktivitelere sahip olduğu ve hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı belirlenmiştir ki bu durum; aynı zamanda hücrelerin epigenetik yapısını da etkileyerek, konsantrasyona bağlı olarak DNA metilasyonunda artışa neden olmuştur.

Sonuç olarak likenlerden elde edilen küçük molekül yapılı; alektoronik asit, kollatolik asit ve kaperatik asit bileşiklerinin; toksik olmayan konsantrasyonlarının, tümör anjiyojenezini ve metastazını baskılama yeteneği sahip oldukları belirlenmiştir. Kaperatik asit bileşiği; diğer liken bileşiklerine göre, düşük toksisiteye ve yüksek anti-anjiyojenik, anti-migrasyon aktivitelerine sahip olması ve DNA metilasyonunun arttırıcı potansiyeli nedeniyle ön plana çıkmakta ve kanser tedavisinde kullanılabilirliği açısından daha fazla umut vaat etmektedir. Bununla birlikte, likenlerden izole edilen bu bileşiklerin aktivite mekanizmaları hakkında daha fazla ve detaylı araştırmaların yapılarak, *in vivo* aktivitelerinin de incelenmesi faydalı olacaktır. Böylece, test bileşiklerinin; kanser tedavisine yönelik kullanımı ve ilaç sektörüne kazandırılması söz konusu olabilecektir. Ayrıca, aktivite mekanizmalarının detaylandırılması sonrasında, bu bileşiklerin model alınması ve yarı sentetik özelliğe sahip yeni bileşik sentezlenmesi veya taklit eden sentetik bileşiklerin keşfedilmesi de söz konusu olabilir.

KAYNAKLAR

Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B. (1979). Controlled synthesis of hbsag in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature,* 282, 615-616.

Aguayo, A., Kantarjian, H., Manshouri, T., Gidel, C., Estey, E., Thomas, D., Koller, C., Estrov, Z., O'Brien, S., Keating, M. (2000). Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood,* 96, 2240-2245.

Ahmadian, M., Wistuba, I.I., Fong, K.M., Behrens, C., Kodagoda, D.R., Saboorian, M.H., Shay, J., Tomlinson, G.E., Blum, J., Minna, J.D. (1997). Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. *Cancer Research,* 57, 3664-3668.

Al-Shabrawey, M., Bartoli, M., El-Remessy, A.B., Platt, D.H., Matragoon, S., Behzadian, M.A., Caldwell, R.W., Caldwell, R.B. (2005). Inhibition of NAD (P) H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy. *The American Journal of Pathology,* 167, 599-607.

Algire, G.H., Chalkley, H.W., Legallais, F.Y., Park, H.D. (1945). Vasculae reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *Journal of the National Cancer Institute,* 6, 73-85.

Anderson, P., Kedersha, N., Ivanov, P. (2015). Stress granules, p-bodies and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms,* 1849, 861-870.

Aplin, A., Howe, A., Alahari, S., Juliano, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews,* 50, 197-264.

Ardi, V.C., Kupriyanova, T.A., Deryugina, E.I., Quigley, J.P. (2007). Human neutrophils uniquely release timp-free mmp-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 104, 20262-20267.

Ari, F. (2013). Changes in gene methylation following chemotherapy in breast cancer cell lines. *Turkish Journal of Biochemistry,* 38, 34-42.

Armstrong, A.J., Marengo, M.S., Oltean, S., Kemeny, G., Bitting, R.L., Turnbull, J.D., Herold, C.I., Marcom, P.K., George, D.J., Garcia-Blanco, M.A. (2011). Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Molecular Cancer Research,* 9, 997-1007.

Atıcı, E. (2007). Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi* 22, 197-204.

Avalos, A., Haza, A.I., Mateo, D., Morales, P. (2014). Cytotoxicity and ros production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *Journal of Applied Toxicology,* 34, 413-423.

Azad, M.B., Chen, Y., Gibson, S.B. (2009). Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): Implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants & Redox Signaling,* 11, 777-790.

Bach, L.A. (2015). Endothelial cells and the IGF system. *Journal of Molecular Endocrinology,* 54, R1-R13.

Beerman, I., Bock, C., Garrison, B.S., Smith, Z.D., Gu, H., Meissner, A., Rossi, D.J. (2013). Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell,* 12, 413-425.

Betz, C., Lenard, A., Belting, H.-G., Affolter, M. (2016). Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development,* 143, 2249-2260.

Billottet, C., Jouanneau, J. (2008). Tumor-stroma interactions. *Bulletin du Cancer,* 95, 51-56.

Binker, M.G., Binker-Cosen, A.A., Richards, D., Gaisano, H.Y., de Cosen, R.H., Cosen-Binker, L.I. (2010). Hypoxia–reoxygenation increase invasiveness of panc-1 cells through RAC1/MMP-2. *Biochemical And Biophysical Research Communications,* 393, 371-376.

Bir, S.C., Kolluru, G.K., Fang, K., Kevil, C.G. (2012). Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. *Seminars in Cell and Developmental Biology,* 23, 745-757.

Bird, C., Kirstein, S. (2009). Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xcelligence system. *Nature Methods,* 6.

Blanco, R., Gerhardt, H. (2013). VEGF and NOTCH in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,* 3, a006569.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany,* 91, 179-194.

Boidot, R., Branders, S., Helleputte, T., Rubio, L.I., Dupont, P., Feron, O. (2014). A generic cycling hypoxia-derived prognostic gene signature: Application to breast cancer profiling. *Oncotarget,* 5, 6947-6963.

Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro,* 2, 1-6.

Bouck, N., Stellmach, V., Hsu, S.C. (1996). How tumors become angiogenic. *Advances in Cancer Research,* 69, 135-174.

Boustie, J., Grube, M. (2005). Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources,* 3, 273-287.

Bristow, R.G., Hill, R.P. (2008). Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews Cancer,* 8, 180-192.

Brown, J. (1979). Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *The British Journal of Radiology,* 52, 650-656.

Burdon, R.H., Gill, V., Rice-Evans, C. (1990). Oxidative stress and tumour cell proliferation. *Free Radical Research Communications,* 11, 65-76.

Cai, T., Fassina, G., Morini, M., Aluigi, M.G., Masiello, L., Fontanini, G., D'Agostini, F., De Flora, S., Noonan, D.M., Albini, A. (1999). N-acetylcysteine inhibits endothelial cell invasion and angiogenesis. *Laboratory Investigation,* 79, 1151-1159.

Candan, M., Yılmaz, M., Tay, T., Erdem, M., Türk, A.Ö. (2007). Antimicrobial activity of extracts of the lichen parmelia sulcata and its salazinic acid constituent. *Zeitschrift für Naturforschung C,* 62, 619-621.

Carmeliet, P. (1999). Developmental biology: Controlling the cellular brakes. *Nature,* 401, 657-658.

Carmeliet, P., Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature,* 407, 249-257.

Carnero, A., Lleonart, M. (2015). The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Inside the Cell, 1, 96-105.*

Chaffer, C.L., Weinberg, R.A. (2015). How does multistep tumorigenesis really proceed?. *Cancer Discovery,* 5, 22-24.

Chambers, A., Groom, A., MacDonald, I. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer,* 2, 563-572.

Chandel, N., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C., Simon, M., Schumacker, P. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 95, 11715-11720.

Chaplin, D., Durand, R., Olive, P. (1986). Acute hypoxia in tumors: Implications for modifiers of radiation effects. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics,* 12, 1279-1282.

Chaplin, D.J., Olive, P.L., Durand, R.E. (1987). Intermittent blood flow in a murine tumor: Radiobiological effects. *Cancer Research,* 47, 597-601.

Chen, J.-X., Zeng, H., Lawrence, M.L., Blackwell, T.S., Meyrick, B. (2006). Angiopoietin-1-induced angiogenesis is modulated by endothelial NADPH oxidase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,* 291, H1563-H1572.

Chen, J., Blume, H.-P., Beyer, L. (2000). Weathering of rocks induced by lichen colonization—a review. *Catena,* 39, 121-146.

Choi, H., Gillespie, D.L., Berg, S., Rice, C., Couldwell, S., Gu, J., Colman, H., Jensen, R.L., Huang, L.E. (2015). Intermittent induction of HIF-1α produces lasting effects on malignant progression independent of its continued expression. *PloS One,* 10, e0125125.

Choi, Y.P., Shim, H.S., Gao, M.-Q., Kang, S., Cho, N.H. (2011). Molecular portraits of intratumoral heterogeneity in human ovarian cancer. *Cancer Letters,* 307, 62-71.

Chooi, Y.-H., Stalker, D.M., Davis, M.A., Fujii, I., Elix, J.A., Louwhoff, S.H., Lawrie, A.C. (2008). Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen xanthoparmelia semiviridis. *Mycological Research,* 112, 147-161.

Chua, C.C., Hamdy, R.C., Chua, B.H. (1998). Upregulation of vascular endothelial growth factor by h 2 o 2 in rat heart endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine,* 25, 891-897.

Chung, A.S., Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology,* 27, 563-584.

Chung, A.S., Lee, J., Ferrara, N. (2010). Targeting the tumour vasculature: Insights from physiological angiogenesis. *Nature Reviews Cancer,* 10, 505-514.

Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, P., Sava, G. (2002). A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften,* 89, 137-146.

Coffelt, S.B., Tal, A.O., Scholz, A., De Palma, M., Patel, S., Urbich, C., Biswas, S.K., Murdoch, C., Plate, K.H., Reiss, Y. (2010). Angiopoietin-2 regulates gene expression in Tie2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Research,* 70, 5270-5280.

Collier, A.C., Pritsos, C.A. (2003). The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochemical Pharmacology,* 66, 281-287.

Condeelis, J., Segall, J.E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer,* 3, 921-930.

Connolly, J.L., Schnitt, S.J., Wang, H.H., Longtine, J.A., Dvorak, A., Dvorak, H.F. (2003). *Tumor structure and tumor stroma generation*. R. A. Wolff, J. Abbruzzese ve D. B. Evans (Ed.), *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th Edition*. Canada: Decker Intellectual Properties.

Contran, R.S., Kumar, V., Robbins, S. (1999). Pathologic basis of disease. *Philadelphia: WB Saunders* 74, 86.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal,* 17, 1195-1214.

Curtis, C.D., Goggins, M. (2005). DNA methylation analysis in human cancer. *Pancreatic Cancer: Methods and Protocols*, 980, 123-136.

De Francesco, E.M., Lappano, R., Santolla, M.F., Marsico, S., Caruso, A., Maggiolini, M. (2013). HIF-1α/GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFS). *Breast Cancer Research,* 15, R64.

Deligianni, D.D., Katsala, N.D., Koutsoukos, P.G., Missirlis, Y.F. (2000). Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials,* 22, 87-96.

Demain, A.L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 41, 185-201.

DeMello, W. (2013). *Intercellular communication*. New York: Springer Publishing.

Deryugina, E.I., Quigley, J.P. (2015). Tumor angiogenesis: Mmp-mediated induction of intravasation-and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biology,* 44, 94-112.

DeSantis, C.E., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Siegel, R.L., Stein, K.D., Kramer, J.L., Alteri, R., Robbins, A.S., Jemal, A. (2014). Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians,* 64, 252-271.

DeVita Jr, V.T., Rosenberg, S.A. (2012). Two hundred years of cancer research. *New England Journal of Medicine* 366, 2207-2214.

Dewhirst, M.W., Cao, Y., Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature Reviews Cancer,* 8, 425-437.

Dickson, D.J., Sham, P.J. (2001). Angiogenesis in acute and chronic leukemias. *Leukemia & Lymphoma,* 42, 847-853.

Dicle, G. (2004). Adezyon moleküller. *ANKEM Dergisi,* 18, 158-163.

Ding, W.-X., Shen, H.-M., Ong, C.-N. (2001). Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A,* 64, 507-519.

Dobson, F.S. (2005). *Lichens: An illustrated guide to the british and irish species*. Slough: The Richmond Publishing Co Ltd.

Dvorak, H., Nagy, J., Dvorak, A. (1991). Structure of solid tumors and their vasculature: Implications for therapy with monoclonal antibodies. *Cancer Cells,* 3, 77-85.

Dy, G.K., Adjei, A.A. (2013). Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies. *CA: A Cancer Journal For Clinicians,* 63, 249-279.

Edwards, H.G., Newton, E.M., Wynn-Williams, D.D., Coombes, S.R. (2003). Molecular spectroscopic studies of lichen substances 1: Parietin and emodin. *Journal of Molecular Structure,* 648, 49-59.

Egger, G., Arimondo, P. (2015). *Drug discovery in cancer epigenetics*. Cambridge: Academic Press-Elsevier.

Ehrenreich, B. ve English D. (2010). *Witches, midwives, and nurses: A history of women healers*. New York: Feminist Press.

Ehrmann, R.L., Knoth, M. (1968). Choriocarcinoma: Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch—studied by light and electron microscopy. *Journal of the National Cancer Institute,* 41, 1329-1341.

Ellis, L.M., Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: Mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer,* 8, 579-591.

Eruslanov, E., Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, 594, 57-72.

Esteller, M. (2011). Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biology Reports,* 3, 9.

Ewald, A.J., Brenot, A., Duong, M., Chan, B.S., Werb, Z. (2008). Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Developmental Cell,* 14, 570-581.

Ferrara, N., Gerber, H.-P., LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine,* 9, 669-676.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: The'seed and soil'hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer,* 3, 453-458.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *New England Journal of Medicine,* 285, 1182-1186.

Folkman, J. (1992). Angiogenesis—retrospect and outlook. R. Steiner, P. B. Weisz, R. Langer (Ed.), *Angiogenesis* içinde 4-13. New York: Springer Publishing.

Frei, E., Elias, A., Wheeler, C., Richardson, P., Hryniuk, W. (1998). The relationship between high-dose treatment and combination chemotherapy: The concept of summation dose intensity. *Clinical Cancer Research,* 4, 2027-2037.

Friedl, P., Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell,* 147, 992-1009.

Friedl, P., Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 10, 445-457.

Friedl, P., Noble, P.B., Walton, P.A., Laird, D.W., Chauvin, P.J., Tabah, R.J., Black, M., Zänker, K.S. (1995). Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants *in vitro*. *Cancer Research,* 55, 4557-4560.

Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling,* 15, 1583-1606.

Fukuda, H., Tomimatsu, T., Watanabe, N., Mu, J.W., Kohzuki, M., Endo, M., Fujii, E., Kanzaki, T., Murata, Y. (2001). Post-ischemic hypothermia blocks caspase-3 activation in the newborn rat brain after hypoxia–ischemia. *Brain Research,* 910, 187-191.

Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O., Samali, A. (2010). Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology,* 2010, 1-23.

Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for rhogtpases in leading and following cells. *Nature Cell Biology,* 9, 1392-1400.

Gama-Sosa, M.A., Slagel, V.A., Trewyn, R.W., Oxenhandler, R., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Research,* 11, 6883-6894.

Garrido-Urbani, S., Jemelin, S., Deffert, C., Carnesecchi, S., Basset, O., Szyndralewiez, C., Heitz, F., Page, P., Montet, X., Michalik, L. (2011). Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPARα mediated mechanism. *PloS One,* 6, e14665.

Gazdar, A.F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., Kodagoda, D., Stasny, V., Cunningham, H.T., Wistuba, I.I. (1998). Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer,* 78, 766-774.

Geiger, B., Spatz, J.P., Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 10, 21-33.

Gerlier, D., Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods,* 94, 57-63.

Gerlinger, M., Swanton, C. (2010). How darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *British Journal of Cancer,* 103, 1139-1143.

Ghorbani, A. (2014). Clinical and experimental studies on polyherbal formulations for diabetes: Current status and future prospective. *Journal of Integrative Medicine,* 12, 336-345.

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. (1973). *In vitro* cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute,* 51, 1417-1423.

Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L. (1999). Embryonic death of MEK1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Current Biology,* 9, 369-376.

Glasauer, A., Chandel, N.S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology,* 92, 90-101.

Goel, H.L., Mercurio, A.M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer,* 13, 871-882.

Goldmann, E. (1907). The growth of malignant disease in man and the lower animals: With special reference to the vascular system. *The Lancet*, 170, 1236-1240.

Granger, D.N., Kvietys, P.R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology,* 6, 524-551.

Greenblatt, M., Philippe, S.K. (1968). Tumor angiogenesis: Transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *Journal of the National Cancer Institute,* 41, 111-124.

Grimes, D.R., Kelly, C., Bloch, K., Partridge, M. (2014). A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *Journal of the Royal Society Interface,* 11, 20131124.

Groebe, K., Vaupel, P. (1988). Evaluation of oxygen diffusion distances in human breast cancer xenografts using tumor-specific *in vivo* data: Role of various mechanisms in the development of tumor hypoxia. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics,* 15, 691-697.

Gronbaek, K., Hother, C., Jones, P.A. (2007). Epigenetic changes in cancer. *Apmis,* 115, 1039-1059.

Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K.J. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 305, 709-718.

Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., Uchida, K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research,* 44, 1098-1124.

Gullino, P.M. (1978). Angiogenesis and oncogenesis. *Journal of the National Cancer Institute,* 61, 639.

Gupta, G.P., Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: Building a framework. *Cell,* 127, 679-695.

Gupta, V.K., Darokar, M.P., Saikia, D., Pal, A., Fatima, A., Khanuja, S.P. (2007). Antimycobacterial activity of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 45, 200-204.

Gura, T. (1997). Systems for identifying new drugs are often faulty. *Science,* 278, 1041-1042.

Guru, S.K., Pathania, A.S., Kumar, S., Ramesh, D., Kumar, M., Rana, S., Kumar, A., Malik, F., Sharma, P., Chandan, B. (2015). Secalonic acid-D represses HIF1A/VEGF-mediated angiogenesis by regulating the AKT/MTOR/P70S6K signaling cascade. *Cancer Research,* 75, 2886-2896.

Gustavsson, B., Carlsson, G., Machover, D., Petrelli, N., Roth, A., Schmoll, H.-J., Tveit, K.-M., Gibson, F. (2015). A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer,* 14, 1-10.

Halıcı, M.G., Hawksworth, D.L., Candan, M., Türk, A.Ö. (2010). A new lichenicolous species of capronia (ascomycota, herpotrichiellaceae), with a key to the known lichenicolous species of the genus. *Fungal Diversity,* 40, 37-40.

Hammond, E.M., Dorie, M.J., Giaccia, A.J. (2003). ATR/ATM targets are phosphorylated by atr in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *Journal of Biological Chemistry,* 278, 12207-12213.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell,* 100, 57-70.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell,* 144, 646-674.

Hansen, K.D., Timp, W., Bravo, H.C., Sabunciyan, S., Langmead, B., McDonald, O.G., Wen, B., Wu, H., Liu, Y., Diep, D. (2011). Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nature Genetics,* 43, 768-775.

Hawinkels, L.J., Zuidwijk, K., Verspaget, H.W., de Jonge-Muller, E.S., van Duijn, W., Ferreira, V., Fontijn, R.D., David, G., Hommes, D.W., Lamers, C.B. (2008). VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis. *European Journal of Cancer,* 44, 1904-1913.

Hedlund, E.-M.E., Yang, X., Zhang, Y., Yang, Y., Shibuya, M., Zhong, W., Sun, B., Liu, Y., Hosaka, K., Cao, Y. (2013). Tumor cell-derived placental growth factor sensitizes antiangiogenic and antitumor effects of anti-VEGF drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 110, 654-659.

Henze, A.-T., Mazzone, M. (2016). The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *Journal of Clinical Investigation,* 126, 3672-3679.

Hicklin, D.J., Ellis, L.M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology,* 23, 1011-1027.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological Reviews,* 56, 549-580.

Honeth, G., Bendahl, P.-O., Ringnér, M., Saal, L.H., Gruvberger-Saal, S.K., Lövgren, K., Grabau, D., Fernö, M., Borg, Å., Hegardt, C. (2008). The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Research,* 10, R53.

Hosaka, K., Yang, Y., Seki, T., Nakamura, M., Andersson, P., Rouhi, P., Yang, X., Jensen, L., Lim, S., Feng, N. (2013). Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF drugs on vascular remodelling and metastasis. *Nature Communications,* 4, 2129.

Hoshi, H., McKeehan, W.L. (1984). Brain-and liver cell-derived factors are required for growth of human endothelial cells in serum-free culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 81, 6413-6417.

Hou, J.-M., Krebs, M., Ward, T., Sloane, R., Priest, L., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Blackhall, F., Dive, C. (2011). Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *The American Journal of Pathology,* 178, 989-996.

Hsieh, C.-H., Lee, C.-H., Liang, J.-A., Yu, C.-Y., Shyu, W.-C. (2010). Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity. *Oncology Reports,* 24, 1629.

Hsieh, C.-H., Wu, C.-P., Lee, H.-T., Liang, J.A., Yu, C.Y., Lin, Y.J. (2012). NADPH oxidase subunit 4 mediates cycling hypoxia-promoted radiation resistance in glioblastoma multiforme. *Free Radical Biology and Medicine,* 53, 649-658.

Huang, Q., Shen, H.M., Ong, C.N. (2005). Emodin inhibits tumor cell migration through suppression of the phosphatidylinositol 3-kinase-CDC42/RAC1 pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences,* 62, 1167-1175.

Humphries, M. J. (2001). Cell adhesion assays. *Molecular Biotechnology,* 18, 57-61.

Huneck, S., Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances. S. Huneck, I. Yoshimura (Ed.), *Identification of lichen substances* içinde 11-123. New York: Springer Publishing.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell,* 110, 673-687.

Iacobuzio-Donahue, C.A. (2009). Epigenetic changes in cancer. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease,* 4, 229-249.

Ide, A., Baker, N., Warren, S., Clark, E., Clark, E. (1939). Vascularization of the brown pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *American Journal of Roentgenology,* 42, 891-899.

Ilina, O., Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *Journal of Cell Science,* 122, 3203-3208.

Ito, T., Ishii, G., Chiba, H., Ochiai, A. (2007). The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene,* 26, 7194-7203.

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation,* 52, 2745.

Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science,* 307, 58-62.

Jiang, W., Sanders, A., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P. (2015) Tissue invasion and metastasis: molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology,* 35, 244-275.

Jung, H.J., Shim, J.S., Lee, J., Song, Y.M., Park, K.C., Choi, S.H., Kim, N.D., Yoon, J.H., Mungai, P.T., Schumacker, P.T. (2010). Terpestacin inhibits tumor angiogenesis by targeting uqcrb of mitochondrial complex iii and suppressing hypoxia-induced reactive oxygen species production and cellular oxygen sensing. *Journal of Biological Chemistry,* 285, 11584-11595.

Junqueira, L., Carneiro, J. (2009). *Temel histoloji.* (Çeviri: Y. Aytekin, S. Solakoğlu). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.

Kaelin, W.G. (2004). The von hippel-lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clinical Cancer Research,* 10, 6290S-6295S.

Kaliss, N. (1952). Regression or survival of tumor homoiografts in mice pretreated with injections of lyophilized tissues. *Cancer Research,* 12, 379-382.

Kalliomäki, T.M., McCallum, G., Lunt, S.J., Wells, P.G., Hill, R.P. (2008). Analysis of the effects of exposure to acute hypoxia on oxidative lesions and tumour progression in a transgenic mouse breast cancer model. *BMC Cancer,* 8, 151.

Kamphaus, G.D., Colorado, P.C., Panka, D.J., Hopfer, H., Ramchandran, R., Torre, A., Maeshima, Y., Mier, J.W., Sukhatme, V.P., Kalluri, R. (2000). Canstatin, a novel

matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of Biological Chemistry,* 275, 1209-1215.

Katz, L., Baltz, R.H. (2016). Natural product discovery: Past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,* 43, 155-176.

Kavradim, S.T., Özer, Z.C., Bozcuk, H. (2013). Hope in people with cancer: A multivariate analysis from turkey. *Journal of Advanced Nursing,* 69, 1183-1196.

Ke, N., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y.A. (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, 740, 33-43.

Kerbel, R.S. (2000). Tumor angiogenesis: Past, present and the near future. *Carcinogenesis,* 21, 505-515.

Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., Brenner, H. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer,* 15, 659-670.

Khalil, A.A., Friedl, P. (2010). Determinants of leader cells in collective cell migration. *Integrative Biology,* 2, 568-574.

Kienast, Y., Von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W.E., Goldbrunner, R., Herms, J., Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature Medicine,* 16, 116-122.

Kiffin, R., Bandyopadhyay, U., Cuervo, A.M. (2006). Oxidative stress and autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling,* 8, 152-162.

Kim, H., Kim, K.K., Hur, J.S. (2015). Anticancer activity of lichen metabolites and their mechanisms at the molecular level. D.K. Upreti, P.K. Divakar, V. Shukla, R. Bajpai (Ed.), *Recent advances in lichenology* içinde 201-208. New York: Springer Publishing.

Kim, K.J., Wang, L., Su, Y.C., Gillespie, G.Y., Salhotra, A., Lal, B., Laterra, J. (2006). Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts. *Clinical Cancer Research,* 12, 1292-1298.

Kim, Y.-W., Byzova, T.V. (2014). Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood,* 123, 625-631.

Kim, Y.M., Kim, K.E., Koh, G.Y., Ho, Y.S., Lee, K.J. (2006). Hydrogen peroxide produced by angiopoietin-1 mediates angiogenesis. *Cancer Research,* 66, 6167-6174.

Kinch, M.S., Haynesworth, A., Kinch, S.L., Hoyer, D. (2014). An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827–2013. *Drug Discovery Today,* 19, 1033-1039.

Klagsbrun, M., Moses, M.A. (1999). Molecular angiogenesis. *Chemistry & Biology,* 6, R217-R224.

Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., De Lanerolle, P., Cheresh, D.A. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Cell Biology,* 137, 481-492.

Klionsky, D.J., Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science,* 290, 1717-1721.

Knighton, D.R., Hunt, T.K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B.J., Werb, Z., Banda, M.J. (1983). Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science,* 221, 1283-1285.

Koch, A.E., Cho, M., Burrows, J.C., Polverini, P.J., Leibovich, S.J. (1992). Inhibition of production of monocyte/macrophage-derived angiogenic activity by oxygen free-radical scavengers. *Cell Biology International Reports,* 16, 415-425.

Koparal, A.T. (2015). Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)-usnic acid and vulpinic acid. *Zeitschrift für Naturforschung C,* 70, 159-164.

Koparal, A.T., Ulus, G., Zeytinoğlu, M., Tay, T., Türk, A.Ö. (2010). Angiogenesis inhibition by a lichen compound olivetoric acid. *Phytotherapy Research,* 24, 754-758.

Koritzinsky, M., Wouters, B.G. (2013). The roles of reactive oxygen species and autophagy in mediating the tolerance of tumor cells to cycling hypoxia. *Seminars in Radiation Oncology*, 4, 252-261.

Koukoulis, G.K., Patriarca, C., Gould, V.E. (1998). Adhesion molecules and tumor metastasis. *Human pathology,* 29, 889-892.

Krishna, S., Low, I.C.C., Pervaiz, S. (2011). Regulation of mitochondrial metabolism: Yet another facet in the biology of the oncoprotein BCL-2. *Biochemical Journal,* 435, 545-551.

Kudo, Y., Iizuka, S., Yoshida, M., Tsunematsu, T., Kondo, T., Subarnbhesaj, A., Deraz, E.M., Siriwardena, S.B., Tahara, H., Ishimaru, N. (2012). Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry,* 287, 38716-38728.

Kwak, H.J., Park, M.J., Park, C.M., Moon, S.I., Yoo, D.H., Lee, H.C., Lee, S.H., Kim, M.S., Lee, H.W., Shin, W.S. (2006). Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-a-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/FLK-1) phosphorylation. *International Journal of Cancer,* 118, 2711-2720.

Lamalice, L., Le Boeuf, F., Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research,* 100, 782-794.

Lancaster, M.V., Fields, R.D. (1996). Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poising agents. *Biotechnology Advances*, 1, 193.

Lee, M.H., Murphy, G. (2004). Matrix metalloproteinases at a glance. *Journal of Cell Science,* 117, 4015-4016.

Lee, S.H., Jeong, D., Han, Y.S., Baek, M.J. (2015). Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Annals of Surgical Treatment and Research,* 89, 1-8.

Lewis, W. (1921). Smooth muscle and endothelium in tissue culture. *Anatomical Record,* 21, 72.

Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P., Zhang, Q. (2015). Ros and autophagy: Interactions and molecular regulatory mechanisms. *Cellular and Molecular Neurobiology,* 35, 615-621.

Li, S., Huang, N.F., Hsu, S. (2005). Mechanotransduction in endothelial cell migration. *Journal of Cellular Biochemistry,* 96, 1110-1126.

Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type ii alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer,* 17, 62-70.

Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry,* 69, 581-593.

Lopes, F.F., da Costa Miguel, M.C., Pereira, A.L.A., da Cruz, M.C.F.N., de Almeida Freitas, R., Pinto, L.P., de Souza, L.B. (2009). Changes in immunoexpression of E-cadherin and β-catenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. *Annals of Diagnostic Pathology,* 13, 22-29.

Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J. (2008). A microrna DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 105, 13556-13561.

Lynch, C.C., Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor–host cell communication. *Differentiation,* 70, 561-573.

Maes, H., Olmeda, D., Soengas, M.S., Agostinis, P. (2016). Vesicular trafficking mechanisms in endothelial cells as modulators of the tumor vasculature and targets of antiangiogenic therapies. *FEBS Journal,* 283, 25-38.

Manojlovic, N.T., Vasiljevic, P.J., Gritsanapan, W., Supabphol, R., Manojlovic, I. (2010). Phytochemical and antioxidant studies of laurera benguelensis growing in Thailand. *Biological Research,* 43, 169-176.

Maruyama, Y. (1963). The human endothelial cell in tissue culture. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie,* 60, 69-79.

Martín-Subero, J. I. ve Esteller, M. (2017). Epigenetic Mechanisms in Cancer Development. W.B. Coleman, G.J. Tsongalis (Ed.) *The Molecular Basis of Human Cancer* içinde 263-275. New York: Springer Publishing.

Maslać, A., Maslać, M., Tkalec, M. (2016). The impact of cadmium on photosynthetic performance and secondary metabolites in the lichens Parmelia sulcata, Flavoparmelia caperata and Evernia prunastri. *Acta Botanica Croatica*, 75, 186-193.

McCawley, L.J., Matrisian, L.M. (2001). Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore!. *Current Opinion in Cell Biology,* 13, 534-540.

Meacham, C.E., Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature,* 501, 328-337.

Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B. (2008). Genome-scale DNA

methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature,* 454, 766-770.

Michiels, C., Tellier, C., Feron, O. (2016). Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer,* 1866, 76-86.

Moeller, B.J., Cao, Y., Li, C.Y., Dewhirst, M.W. (2004). Radiation activates hif-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell,* 5, 429-441.

Molnár, K., Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review. *Zeitschrift für Naturforschung C,* 65, 157-173.

Moniri, M.R., Young, A., Reinheimer, K., Rayat, J., Dai, L.-J., Warnock, G.L. (2015). Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology,* 67, 379-386.

Morgan, T.M., Lange, P.H., Porter, M.P., Lin, D.W., Ellis, W.J., Gallaher, I.S., Vessella, R.L. (2009). Disseminated tumor cells in prostate cancer patients after radical prostatectomy and without evidence of disease predicts biochemical recurrence. *Clinical Cancer Research,* 15, 677-683.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods,* 65, 55-63.

Moutasim, K.A., Nystrom, M.L., Thomas, G.J. (2011). Cell migration and invasion assays. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 37, 333-343.

Muggia, L., Grube, M., Tretiach, M. (2008). Genetic diversity and photobiont associations in selected taxa of the Tephromela atra group (Lecanorales, lichenised Ascomycota). *Mycological Progress*, 7, 147.

Murphy, A.N., Unsworth, E.J., Stetler-Stevenson, W.G. (1993). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bfgf-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology,* 157, 351-358.

Mutoh, A., Ueda, S. (2013). Peroxidized unsaturated fatty acids stimulate toll-like receptor 4 signaling in endothelial cells. *Life Sciences,* 92, 984-992.

Müller, K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 56, 9-16.

Nagase, H., Woessner, J.F. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry,* 274, 21491-21494.

Nagy, J.A., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F. (2012). Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,* 2, a006544.

Nagy, J.A., Dvorak, H.F. (2012). Heterogeneity of the tumor vasculature: The need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clinical & Experimental Metastasis,* 29, 657-662.

Nagy, J.A., Masse, E.M., Herzberg, K.T., Meyers, M.S., Yeo, K.-T., Yeo, T.-K., Sioussat, T.M., Dvorak, H.F. (1995). Pathogenesis of ascites tumor growth: Vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Research,* 55, 360-368.

Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., Chapple, S., Cohen, G., Feher, J., Grune, T. (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Research,* 44, 1125-1171.

Ng, K.W., Leong, D.T., Hutmacher, D.W. (2005). The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue Engineering,* 11, 182-191.

Nguyen, K.-H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., Tomasi, S. (2013). Uv-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural Product Reports,* 30, 1490-1508.

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research,* 59, 365-378.

Norton, K.A., Popel, A.S. (2016). Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Scientific Reports,* 6, 36992.

Norton, L., Simon, R. (1986). The norton-simon hypothesis revisited. *Cancer Treatment Reports,* 70, 163.

Nybakken, L., Helmersen, A.-M., Gauslaa, Y., Selås, V. (2010). Lichen compounds restrain lichen feeding by bank voles (myodes glareolus). *Journal of Chemical Ecology,* 36, 298-304.

Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 2, 211-216.

Olive, P.L., Vikse, C., Trotter, M.J. (1992). Measurement of oxygen diffusion distance in tumor cubes using a fluorescent hypoxia probe. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics,* 22, 397-402.

Orange, A., James, P.W., White, F. (2001). *Microchemical methods for the identification of lichens*. Woodbridge: Twayne Publishers.

Orr, A.L., Vargas, L., Turk, C.N., Baaten, J.E., Matzen, J.T., Dardov, V.J., Attle, S.J., Li, J., Quackenbush, D.C., Goncalves, R.L. (2015). Suppressors of superoxide production from mitochondrial complex iii. *Nature Chemical Biology,* 11, 834-836.

Osborn, L. (1990). Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell,* 62, 3-6.

Otey, C.A., Carpen, O. (2004). α-actinin revisited: A fresh look at an old player. *Cell Motility and the Cytoskeleton,* 58, 104-111.

Otto, F. (1990). Dapi staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in Cell Biology,* 33, 105-110.

Ovadje, P., Roma, A., Steckle, M., Nicoletti, L., Arnason, J.T., Pandey, S. (2015). Advances in the research and development of natural health products as main stream cancer therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2015, 1-12.

Owen, J.L., Iragavarapu-Charyulu, V., Gunja-Smith, Z., Herbert, L.M., Grosso, J.F., Lopez, D.M. (2003). Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: Role of vascular endothelial growth factor. *The Journal of Immunology,* 171, 4340-4351.

Özkay, Y., Yurttaş, L., Dikmen, M., Engür, S. (2016). Synthesis and antiproliferative activity evaluation of new thiazole–benzimidazole derivatives using real-time cell analysis (RTCA DP). *Medicinal Chemistry Research*, 25, 482-493.

Paduch, R. (2016). The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cellular Oncology*, 39, 397-410.

Parsons, J.T., Horwitz, A.R., Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 11, 633-643.

Pignatelli, M., Vessey, C.J. (1994). Adhesion molecules: Novel molecular tools in tumor pathology. *Human Pathology,* 25, 849-856.

Pipinikas, C.P., Carter, N.D., Corbishley, C.M., Fenske, C.D. (2008). Hif-1α mrna gene expression levels in improved diagnosis of early stages of prostate cancer. *Biomarkers,* 13, 680-691.

Ponce, M.L. (2009). Tube formation: An in vitro matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis Protocols: Second Edition*, 467, 183-188.

Postovit, L.M., Abbott, D.E., Payne, S.L., Wheaton, W.W., Margaryan, N.V., Sullivan, R., Jansen, M.K., Csiszar, K., Hendrix, M.J., Kirschmann, D.A. (2008). Hypoxia/reoxygenation: A dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. *Journal of Cellular Biochemistry,* 103, 1369-1378.

Puklin-Faucher, E., Sheetz, M.P. (2009). The mechanical integrin cycle. *Journal of Cell Science,* 122, 179-186.

Purvis, O.W., Pawlik-Skowrońska, B. (2008). Lichens and metals*. British Mycological Society Symposia Series,* 27, 175-200.

Quail, D.F., Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine,* 19, 1423-1437.

Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Research,* 74, 2913-2921.

Rankin, E.B., Nam, J.-M., Giaccia, A.J. (2016). Hypoxia: Signaling the metastatic cascade. *Trends in Cancer,* 2, 295-304.

Repesh, L.A. (1988). A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. *Invasion & Metastasis,* 9, 192-208.

Ribatti, D. (2009). Endogenous inhibitors of angiogenesis: A historical review. *Leukemia Research,* 33, 638-644.

Riggs, A.D., Jones, P.A. (1983). 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Advances in Cancer Research,* 40, 1-30.

Rosangkima, G., Prasad, S. (2004). Antitumour activity of some plants from meghalaya and mizoram against murine ascites dalton's lymphoma. *Indian Journal of Experimental Biology,* 42, 981-988.

Rouschop, K.M., Ramaekers, C.H., Schaaf, M.B., Keulers, T.G., Savelkouls, K.G., Lambin, P., Koritzinsky, M., Wouters, B.G. (2009). Autophagy is required during cycling hypoxia to lower production of reactive oxygen species. *Radiotherapy and Oncology,* 92, 411-416.

Ruef, J., Hu, Z.Y., Yin, L.Y., Wu, Y., Hanson, S.R., Kelly, A.B., Harker, L.A., Rao, G.N., Runge, M.S., Patterson, C. (1997). Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries a novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circulation Research,* 81, 24-33.

Rundhaug, J.E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 9, 267-285.

Saad, B., Azaizeh, H., Said, O. (2005). Tradition and perspectives of arab herbal medicine: A review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2, 475-479.

Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. *Nature Reviews Cancer,* 7, 737-749.

Sakai, W., Swisher, E.M., Karlan, B.Y., Agarwal, M.K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D.J., Couch, F.J. (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature,* 451, 1116-1120.

Salinas, C.N., Anseth, K.S. (2008). The influence of the rgd peptide motif and its contextual presentation in peg gels on human mesenchymal stem cell viability. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine,* 2, 296.

Sasaki, H., Fukuda, S., Otani, H., Zhu, L., Yamaura, G., Engelman, R.M., Das, D.K., Maulik, N. (2002). Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: A novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology,* 34, 335-348.

Scherz-Shouval, R., Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology,* 17, 422-427.

Scherz-Shouval, R., Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ros: Physiology and pathology. *Trends in Biochemical Sciences,* 36, 30-38.

Seidman, A.D. (2005). Current status of dose-dense chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology,* 56, 78-83.

Sena, L.A., Chandel, N.S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell,* 48, 158-167.

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science,* 219, 983-985.

Shapiro, C.L., Recht, A. (2001). Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine,* 344, 1997-2008.

Shapiro, I.M., Cheng, A.W., Flytzanis, N.C., Balsamo, M., Condeelis, J.S., Oktay, M.H., Burge, C.B., Gertler, F.B. (2011). An emt–driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genetics,* 7, e1002218.

Sharma, S., Gupta, R. (2015). Drug development from natural resource: A systematic approach. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry,* 15, 52-57.

Shaw, L.M. (2005). Tumor cell invasion assays. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, 294, 97-105.

Sheen-Chen, S.-M., Eng, H.L., Sheen, C.-W., Cheng, Y.-F., Chou, F., Chen, W. (1996). Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with breast cancer. *Anticancer Research,* 17, 2823-2826.

Shimizu, S.I., Nomoto, M., Yamamoto, T., Momose, K. (1994). Reduction by NG-nitro-L-arginine of H_2O_2-induced endothelial cell injury. *British Journal of Pharmacology,* 113, 564-568.

Shrestha, G., Clair, L.L.S. (2013). Lichens: A promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews,* 12, 229-244.

Shrimali, D., Shanmugam, M.K., Kumar, A.P., Zhang, J., Tan, B.K., Ahn, K.S., Sethi, G. (2013). Targeted abrogation of diverse signal transduction cascades by emodin for the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Letters,* 341, 139-149.

Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, C., Fedewa, S. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians,* 62, 220-241.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians,* 65, 5-29.

Sigerist, H.E. (1960). *On the history of medicine*. Missouri: MD publications.

Sivas, H. Z. (2015). Antigenotoxic Effect of Some Lichen Metabolites. B. Ranković (Ed.), *Lichen Secondary Metabolites* içinde 147-164. New York: Springer Publishing

Smith, C.W. (2009). *Lichens of great britain and ireland*. London: British Lichen Society.

Solecki, R.S. (1975). Shanidar iv, a neanderthal flower burial in northern iraq. *Science,* 190, 880-881.

Song, Y., Dai, F., Zhai, D., Dong, Y., Zhang, J., Lu, B., Luo, J., Liu, M., Yi, Z. (2012). Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis,* 15, 421-432.

Spirig, R., Djafarzadeh, S., Regueira, T., Shaw, S.G., Von Garnier, C., Takala, J., Jakob, S.M., Rieben, R., Lepper, P.M. (2010). Effects of tlr agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1α and dendritic cell maturation under normoxic conditions. *PloS One,* 5, e10983.

Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *The Lancet,* 347, 1377-1381.

Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology,* 200, 448-464.

Stocker-Wörgötter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: Culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports,* 25, 188-200.

Stoecklein, N.H., Hosch, S.B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C.H., Vay, C., Siegmund, A., Scheunemann, P., Schurr, P., Knoefel, W.T. (2008). Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell,* 13, 441-453.

Sun, Q., Li, X. (2015). Targeting cyclic hypoxia to prevent malignant progression and therapeutic resistance of cancers. *Histology and Histopathology,* 30, 51-60.

Szatrowski, T.P., Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research,* 51, 794-798.

Talmadge, J.E., Fidler, I.J. (2010). Aacr centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Research,* 70, 5649-5669.

Tan, W., Lu, J., Huang, M., Li, Y., Chen, M., Wu, G., Gong, J., Zhong, Z., Xu, Z., Dang, Y. (2011). Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chinese Medicine,* 6, 27.

Tay, T., Türk, A.Ö., Yılmaz, M., Türk, H., Kıvanç, M. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen ramalina farinacea and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C,* 59, 384-388.

Toffoli, S., Michiels, C. (2008). Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *FEBS Journal,* 275, 2991-3002.

Toffoli, S., Roegiers, A., Feron, O., Van Steenbrugge, M., Ninane, N., Raes, M., Michiels, C. (2009). Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: Role of HIF-1. *Angiogenesis,* 12, 47-67.

Tojo, T., Ushio-Fukai, M., Yamaoka-Tojo, M., Ikeda, S., Patrushev, N., Alexander, R.W. (2005). Role of GP91phox (NOX2)-containing NAD (P) H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation,* 111, 2347-2355.

Trotter, M., Chaplin, D., Olive, P. (1989). Use of a carbocyanine dye as a marker of functional vasculature in murine tumours. *British Journal of Cancer,* 59, 706.

Trotter, M.J., Chaplin, D.J., Durand, R.E., Olive, P.L. (1989). The use of fluorescent probes to identify regions of transient perfusion in murine tumors. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics,* 16, 931-934.

Tsuda, K. (2012). Associations of oxidative stress and inflammation and their role in the regulation of membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: An electron spin resonance investigation. *Advances in Bioscience and Biotechnology,* 3, 1020.

Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology,* 552, 335-344.

Ulrich, F., Carretero-Ortega, J., Menéndez, J., Narvaez, C., Sun, B., Lancaster, E., Pershad, V., Trzaska, S., Véliz, E., Kamei, M. (2016). Reck enables cerebrovascular development by promoting canonical WNT signaling. *Development,* 143, 147-159.

Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S.I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M.T., Pagano, P.J., Johnson, C., Alexander, R.W. (2002). Novel role of GP91phox-containing NAD (P) H oxidase in vascular endothelial growth factor–induced signaling and angiogenesis. *Circulation Research,* 91, 1160-1167.

V Simoben, C., Ibezim, A., Ntie-Kang, F., N Nwodo, J., L Lifongo, L. (2015). Exploring cancer therapeutics with natural products from african medicinal plants, part i: Xanthones, quinones, steroids, coumarins, phenolics and other classes of compounds. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry,* 15, 1092-1111.

Valarmathi, R., Hariharan, G., Venkataraman, G., Parida, A. (2009). Characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from lichen dirinaria applanata. *Phytochemistry,* 70, 721-729.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C,* 27, 120-139.

Valencia-Islas, N., Zambrano, A., Rojas, J. (2007). Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens exposed to chronic oxidant air pollution from mexico city. *Journal of Chemical Ecology,* 33, 1619-1634.

Valster, A., Tran, N.L., Nakada, M., Berens, M.E., Chan, A.Y., Symons, M. (2005). Cell migration and invasion assays. *Methods,* 37, 208-215.

van der Schaft, D.W., Seftor, R.E., Seftor, E.A., Hess, A.R., Gruman, L.M., Kirschmann, D.A., Yokoyama, Y., Griffioen, A.W., Hendrix, M.J. (2004). Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *Journal of the National Cancer Institute,* 96, 1473-1477.

Van Zee, K.J., Calvano, J.E., Bisogna, M. (1998). Hypomethylation and increased gene expression of P16 INK4A in primary and metastatic breast carcinoma as compared to normal breast tissue. *Oncogene,* 16, 2723-2727.

Vanhollebeke, B., Stone, O.A., Bostaille, N., Cho, C., Zhou, Y., Maquet, E., Gauquier, A., Cabochette, P., Fukuhara, S., Mochizuki, N. (2015). Tip cell-specific requirement for an atypical GPR124-and reck-dependent WNT/β-catenin pathway during brain angiogenesis. *Elife,* 4, e06489.

Varol, M. (2013). *Liken asitlerinin ultraviyole ışınlarına karşı koruyucu etkisinin incelenmesi*. Master thesis. Graduate School of Science, Anadolu University.

Varol, M. (2015). Natural small-molecules obtained from lichens as a novel source of anti-angiogenic agents. *Journal of Applied Pharmacy,* 8, e105.

Varol, M. (2016a). Darwinian principles toward multidrug-resistant cancer cells. *Journal of Applied Pharmacy,* 8, e111.

Varol, M. (2016b). The importance of metal-based drugs in medicinal inorganic chemistry to improve life quality of patients. *Journal of Applied Pharmacy,* 8, e107.

Varol, M. (2016c). Ultrasound-mediated cancer therapy as a noninvasive and repeatable treatment strategy. *Journal of Applied Pharmacy*, 8, e109.

Varol, M., Tay, T., Candan, M., Türk, A., Koparal, A.T. (2015). Evaluation of the sunscreen lichen substances usnic acid and atranorin. *Biocell,* 39, 25-31.

Varol, M., Türk, A., Candan, M., Tay, T., Koparal, A.T. (2016). Photoprotective activity of vulpinic and gyrophoric acids toward ultraviolet B-induced damage in human keratinocytes. *Phytotherapy Research,* 30, 9-15.

Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., Horwitz, A.R. (2009). Integrins in cell migration–the actin connection. *Journal of Cell Science,* 122, 199-206.

Vihinen, P., Kähäri, V.M. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *International Journal of Cancer,* 99, 157-166.

Voron, T., Marcheteau, E., Pernot, S., Colussi, O., Tartour, E., Taieb, J., Terme, M. (2014). Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Frontiers in Oncology,* 4, 70.

Wang, X., Zhang, J., Fan, M., Zhou, Q., Deng, H., Aisharif, M.J., Chen, X. (2009). The expression of e-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: Immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology,* 107, 547-554.

Wang, Y., Zang, Q.S., Liu, Z., Wu, Q., Maass, D., Dulan, G., Shaul, P.W., Melito, L., Frantz, D.E., Kilgore, J.A. (2011). Regulation of vegf-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Cell Physiology,* 301, C695-C704.

Wang, Z., Dabrosin, C., Yin, X., Fuster, M.M., Arreola, A., Rathmell, W.K., Generali, D., Nagaraju, G.P., El-Rayes, B., Ribatti, D. (2015). Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Seminars in Cancer Biology,* 35, S224-S243.

Waypa, G.B., Smith, K.A., Schumacker, P.T. (2016). O_2 sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. *Molecular Aspects of Medicine,* 47, 76-89.

Weis, S.M., Cheresh, D.A. (2011). Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine,* 17, 1359-1370.

Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *The Journal of Clinical Investigation,* 123, 3190-3200.

Wenger, R.H., Kurtcuoglu, V., Scholz, C.C., Marti, H.H., Hoogewijs, D. (2015). Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia,* 3, 35-43.

West, R.J., Sweeney, S.T. (2012). Oxidative stress and autophagy: mediators of synapse growth?. *Autophagy, 8, 284-285.*

Wheeler, M.D., Smutney, O.M., Samulski, R.J. (2003). Secretion of extracellular superoxide dismutase from muscle transduced with recombinant adenovirus inhibits the growth of B16 melanomas in mice. *Molecular Cancer Research,* 1, 871-881.

Wigerup, C., Påhlman, S., Bexell, D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & Therapeutics, 164, 152-169.*

Wiley, D.M., Kim, J.-D., Hao, J., Hong, C.C., Bautch, V.L., Jin, S.-W. (2011). Distinct signalling pathways regulate sprouting angiogenesis from the dorsal aorta and the axial vein. *Nature Cell Biology,* 13, 686-692.

Winograd, B., Peckham, M., Pinedo, H.M. (2013). *Human tumour xenografts in anticancer drug development*. New York: Springer Publishing.

Wirth, V., Hauck, M., Schultz, M., De Bruyn, U. (2013). *Die Flechten Deutschlands*. Stuttgart: Ulmer.

Xue, Y., Lim, S., Yang, Y., Wang, Z., Jensen, L.D.E., Hedlund, E.-M., Andersson, P., Sasahara, M., Larsson, O., Galter, D. (2012). PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nature Medicine,* 18, 100-110.

Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Sharma, V. (2015). Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research,* 9, XE01-XE05.

Yamagishi, S.-i., Amano, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Takeuchi, M., Inoue, H. (2003). Pigment epithelium-derived factor inhibits leptin-induced angiogenesis by suppressing vascular endothelial growth factor gene expression through anti-oxidative properties. *Microvascular Research,* 65, 186-190.

Yasuda, M., Ohzeki, Y., Shimizu, S., Naito, S., Ohtsuru, A., Yamamoto, T., Kuroiwa, Y. (1998). Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sciences,* 64, 249-258.

Yavuz, Y., Özdemir Türk, A., Böcük, H. (2015). Epiphytic lichen diversity of the sündiken mountains (Eskisehir, Turkey). *Herzogia,* 28, 753-761.

Yilmaz, M., Türk, A., Tay, T., Kivanç, M. (2003). The antimicrobial activity of extracts of the lichen cladonia foliacea and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences,* 59, 249-254.

Zaidel-Bar, R., Geiger, B. (2010). The switchable integrin adhesome. *Journal of Cell Science,* 123, 1385-1388.

Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., Geiger, B. (2007). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science,* 120, 137-148.

Zhang, J., Qiao, L., Liang, N., Xie, J., Luo, H., Deng, G., Zhang, J. (2016). Vasculogenic mimicry and tumor metastasis. *Official Journal of the Balkan Union of Oncology,* 21, 533-541.

Zheng, H., Takahashi, H., Murai, Y., Cui, Z., Nomoto, K., Niwa, H., Tsuneyama, K., Takano, Y. (2006). Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Research,* 26, 3579-3583.

Ziegler, W.H., Liddington, R.C., Critchley, D.R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends in Cell Biology,* 16, 453-460.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı	**:**	Mehmet VAROL
Yabancı Dil	**:**	İngilizce ve İtalyanca
Doğum Yeri ve Yılı	**:**	Ankara/1986
E-Posta	**:**	mehmetv@anadolu.edu.tr

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2015, Araştırma Görevlisi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- 2015, Anadolu Üniversitesi, İşletme Fakültesi, İşletme Bölümü, Lisans Programı
- 2013, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı, Yüksek Lisans Programı
- 2010, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Lisans Programı
- 2009, Universitá Degli Studi Di Palermo, Facoltá di Sc. MM.FF.NN., Socrates/Erasmus Programı

Yayınları ve Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

- Varol, M., Candan, M. (2016). Anti-breast cancer activities of some secondary metabolites isolated from lichen species. *41st FEBS Congress "Molecular and Systems Biology for a Better Life",* Aydın, Turkey, s.107.
- Varol, M., Candan, M. (2016). Anti-breast cancer activities of anti-angiogenic diphenyl ethers derived from lichens: collatolic and alectoronic acids. *6th European Association of Chemical and Materials Societies (EuCheMs) International Congress,* Seville, Spain, s.1.
- Varol, M. (2016). Natural small-molecules obtained from lichens as a novel source of anti-angiogenic agents. *6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi,* Konya, Turkey, s.27.

- Varol, M., Dikmen, M. (2016). Dynamic assessment of antiproliferative and antimigratory activities of the natural small-molecule alectoronic acid by using real time cell analyzers (rtca). *6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi,* Konya, Turkey, s.89.
- Candan, M., Varol, A., Karabacak, R.B., Koparal, A.T., Varol, M., Tay, T. (2016). Alteration of anti-proliferative activity of vulpinic acid in novel colloidal system vulpinic acid treated poly (vinyl benzyl chloride). *ISACS19: Challenges in Organic Chemistry,* Irvine, USA, s.P05.
- Candan, M., Varol, A., Koparal, A.T., Varol, M., Tay, T. (2016). Blockage of ultraviolet B-induced damage in human keratinocytes by a lichen compound norstictic acid. *41st FEBS Congress "Molecular and Systems Biology for a Better Life",* Aydın, Turkey, s.344.
- Tay, T., Varol, A., Koparal, A.T., Varol, M., Candan, M. (2016). Investigation of some lichen-derived substances' cosmetic potential for skin protection against ultraviolet B. *41st FEBS Congress "Molecular and Systems Biology for a Better Life",* Aydın, Turkey, s.344.
- Varol, A., Elmalı, D., Varol, M., Salih, B., Koparal, A.T. (2016). Across adjacent ring formed titanium phthalocyanine-mediated photodynamic therapy alters and degrades filamentous actin cytoskeleton and internal membranes. *41st FEBS Congress "Molecular and Systems Biology for a Better Life",* Aydın, Turkey, s.413.
- Varol, A., Elmalı, D., Varol, M., Salih, B., Koparal, A.T. (2016). Internal membranes and actin cytoskeleton alteration by zinc phthalocyanine-mediated photodynamic therapy on human lung carcinoma and keratinocyte cells. *6th European Association of Chemical and Materials Societies (EuCheMs) International Congress,* Seville, Spain, s.1.
- Elmalı, D., Varol, A., Koparal, A.T., Varol, M., Salih, B., Bekaroğlu, Ö. (2016). Facile synthesis of unprecedented heteronuclear phthalocyanine ring and its evaluation in photodynamic therapy. *28th National Chemistry Congress (with International Participation),* Mersin, Turkey, s.1.

- Varol, M. (2016). The importance of metal-based drugs in medicinal inorganic chemistry to improve life quality of patients. *Journal of Applied Pharmacy*, 8, e107.
- Varol, M. (2016). Ultrasound-mediated cancer therapy as a noninvasive and repeatable treatment strategy. *Journal of Applied Pharmacy*, 8, e109.
- Varol, M. (2016). Darwinian principles toward multidrug-resistant cancer cells. *Journal of Applied Pharmacy*, 8, e111.
- Varol, M., Türk, A., Candan, M., Tay, T., Koparal, A.T. (2016). Photoprotective activity of vulpinic and gyrophoric acids toward ultraviolet B-induced damage in human keratinocytes. *Phytotherapy Research*, 30, 9-15.
- Varol, M. (2015). Natural small-molecules obtained from lichens as a novel source of anti-angiogenic agents . *Journal of Applied Pharmacy*, 8, e105.
- Varol, M. (2015). An alternative treatment modality of diseases using photodynamic therapy with a wide range biological targeting possibility. *Research Journal of Biology*, 3, 21-25.
- Varol, M., Tay, T., Candan, M., Türk, A., Koparal, A.T. (2015). Evaluation of the sunscreen lichen substances usnic acid and atranorin. *Biocell*, 39, 25-31.
- Varol, M., Elmalı, D., Salih, B., Varol, A., Koparal, A.T. (2015). Novel across adjacent ring formed metallophthalocyanines-mediated photodynamic therapy inhibits the proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells and human keratinocytes HaCaT cells. *3rd International BAU-Drug Design Congress,* İstanbul, Turkey, s.194.
- Varol, A., Candan, M., Tay, T., Türk, A., Koparal, A.T., Varol, M. (2015). Anti-cancer and anti-angiogenic activities of a lichen-derived substance: alpha-collatolic acid. *5th International Congress of Molecular Medicine,* İzmir, Turkey, s.58.
- Varol, A., Koparal, A.T., Varol, M., Candan, M., Tay, T., Türk, A. (2015). A natural small-molecule alectoronic acid inhibits angiogenesis and suppresses proliferation of various cancer cells. *EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress,* İzmir, Turkey, s.65.

- Varol, A., Elmalı, D., Varol, M., Koparal, A.T., Salih, B. (2015). Investigation of new sandwich-type metallophthalocyanines-mediated photodynamic therapy. *IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey,* Ankara, Turkey, s.133.
- Varol, M., Koparal, A.T., Bostancıoğlu, R.B., Benkli, K. (2014). Anticancer activity of structurally related Au(III) and Pt(II) complexes of the novel derivatives of 4-Dihydroxyboryl-DL-diphenylalanine. *2nd International BAU-Drug Design Congress,* İstanbul, Turkey, s.178.
- Rosselli, S., Bruno, M., Raimondo, M., Spadaro, V., Varol, M., Koparal, A.T., Maggio, M. (2012). Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of Tanacetum vulgare ssp. Siculum. *Molecules,* 17, 8186-8195.
- Varol, M., Bruno, M., Koparal, A.T., Rosselli, S., Maggio, A.M. (2011). Cytotoxic effect of sesquiterpenes isolated from dichloromethane (DCM) extract of Tanacetum vulgare subsp sicilum (Guss.). *36th FEBS Congress: Biochemistry for tomorrow's medicine,* Turin, Italy, s.339.

Ödülleri:

- 2016, TÜBİTAK - Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı. 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Bursu, Ankara.
- 2014, 3rd best poster award, 2nd international BAU-drug design congress, Bahçeşehir Üniversitesi, İstanbul.
- 2008, European Commission. ERASMUS- Lifelong Learning Programme, Italy.