T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

İNSAN SERVİKAL KANSER HÜCRE HATTINDA (HeLa) DİFRAKTAİK, EVERNİK VE VULPİNİK LİKEN ASİTLERİNİN TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ 1 HEDEFLİ ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Büşra BUDAK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ömer Erkan YAPÇA

ERZURUM-2022

ONAY

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanlığının 30.02.2020 tarih ve 2000327952 sayılı "İnsan Servikal Kanser Hücre Hattında (HeLa) Difraktaik, Evernik ve Vulpinik Liken Asitlerinin Tiyoredoksin Redüktaz l Hedefli Antikanser Etkisinin Araştırılması" konulu tezimizle ilgili Cerrahi Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığınca düzenlenen oturumda tez ile ilgili yazımız görüşülmüş olup; 06.01.2021 tarih ve karar no: 02 ile tezimiz kabul edilmiştir. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 04.03.2021 tarih B.30.2.ATA.0.01.00/ sayılı yazısıyla tarafımıza bildirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ONAY ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ ..... **viii**
TEŞEKKÜR ..... **xi**
ÖZET ..... **xiii**
ABSTRACT ..... **xiv**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Kanser ve Ayırt Edici Özellikleri 3
2.1.1. Proliferatif Sinyalleşmenin Sürdürülmesi 4
2.1.2. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçmak 4
2.1.3. Hücresel Ölüme Direnç 5
2.1.4. Replikatif Ölümsüzlüğün Sağlanması 7
2.1.5. Anjiyogenez İndüksiyonu 7
2.1.6. İnvazyon ve Metastaz Aktivasyonu 8
2.2. Kanser Epidemiyolojisi 10
2.2.1. Kadınlarda Kanser Epidemiyolojisi 12
2.3. Kanser Tedavisi 13
2.3.1. Cerrahi 13
2.3.2. Kemoterapi 13
2.3.3. Radyoterapi 13
2.3.4. İmmünoterapi 14
2.3.5. Gen Tedavisi 14
2.4. Serviks Kanseri 14
2.4.1. Serviks Anatomisi 14
2.4.2. Serviks Kanseri Epidemiyolojisi 15
2.4.3. Serviks Kanseri Risk Faktörleri 16
2.4.4. Serviks Kanserinin Erken Tespiti ve Önlenmesi 18
2.4.4.1. Ülkemizde Serviks Kanseri Tarama Stratejisi 19
2.4.4.2. Servikal İntraepitelyal Neoplazi 19
2.4.5. Serviks Kanserinin Evrelenmesi 21
2.4.6. Serviks Kanserinin Histopatolojisi 22

2.4.7. Serviks Kanserinde Klinik ve Prognoz 22
2.4.8. Serviks Kanserinin Tedavisi 23
2.4.8.1. Erken Evre Serviks Kanseri Tedavisi 24
2.4.8.2. Lokal İleri Evre Serviks Kanseri Tedavisi 25
2.4.8.3. Metastatik Hastalığın Tedavisi 26
2.4.8.4. Nüks Serviks Kanserinin Tedavisi 27
2.5. Kanser ve Oksidatif Stres 29
2.5.1. Antioksidan Sistem 30
2.5.1.1. Tiyoredoksin Sistem 30
2.5.1.2. Kanser Tedavisinde Tiyoredoksin Sistemin Hedeflenmesi 33
2.6. Kanser Tedavisinde Doğal Ürünler 35
2.6.1. Liken Asitleri 36
2.6.1.1. Liken Asitleri ve Kanser 37
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 42
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 42
3.2. Kullanılan Materyal ve Cihazlar 43
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı 45
3.4. Hücre Kültürü 46
3.4.1. HeLa Hücrelerin Çözdürülmesi 46
3.4.2. HeLa Hücrelerinin Pasajlanması 46
3.4.3. HeLa Hücrelerinin Dondurulması 47
3.4.4. Hücre Sayımı 47
3.5. Liken Asitlerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması 48
3.6. Hücre Proliferasyon Analizi 48
3.7. Apoptoz Testi 49
3.8. Transwell Migrasyon Testi 51
3.9. Kantitatif Gen Ekspresyon Analizi 51
3.9.1. Total RNA İzolasyonu 51
3.9.2. Total RNA'ların Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi 52
3.9.3. Total RNA Örneklerinden cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması 52
3.9.4. Real-Time PCR 53
3.9.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiki Analizler 54
3.10. Western Blot Yöntemi ile Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi 54
3.10.1. HeLa Hücresinden Proteinin Homojenatının Hazırlanması 54
3.10.2. Bradford (Commassie Brillant Blue) Yöntemi ile Protein Tayini 55

3.10.3. SDS Jelinin Hazırlanması ve Yüklenmesi 56
3.10.4. Jel Üzerinde Fragmentlere Ayrılan Proteinlerin Membrana Transfer Edilmesi (Blotlama), Bloklanması ve Görüntülenmesi 57
3.11. Tiyoredoksin Redüktaz 1 Enzim Aktivite Ölçümü 59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 61
4.1. HeLa Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Uygulanması ve IC_{50} Değerlerinin Hücre Proliferasyon Analizi (XTT) ile Belirlenmesi 61
4.2. Flow (Akım) Sitometri ile Apoptoz Analizi Sonuçları 64
4.3. Migrasyon Analizi Sonuçları 68
4.4. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları 71
4.4.1. mRNA Saflık ve Konsantrasyon Sonuçları 71
4.4.2. cDNA Saflık ve Konsantrasyon Sonuçları 71
4.4.3. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Analizi Sonuçları 72
4.5. Kantitatif Protein Ekspresyon Analiz (Western Blot) Sonuçları 76
4.6. Tiyoredoksin Redüktaz 1 (TrxR1) Enzim Aktivitesi Sonuçları 77
5. TARTIŞMA 78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 85
KAYNAKLAR 87

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Genel popülasyonda ve kadınlarda DALY'ler olarak tahmin edilen ilk 5 hastalık..10
Tablo 2. Dünya genelinde 2000 ve 2016 yıllarında önde gelen 5 ölüm nedeni 10
Tablo 3. 2020 yılında 36 kanserde yeni vaka ve ölümlerin sayısı.....11
Tablo 4. Serviks Kanseri 2018 FIGO Evrelemesi.....21
Tablo 5. WHO Kadın Genital Tümör Sınıflandırmasında Serviks Kanserinin Histolojik Tipleri 22
Tablo 6. 2009 ve 2018 FIGO sınıflandırılmasının 5 yıllık sağkalım yüzdeleri.....23
Tablo 7. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar ve kitler.....42
Tablo 8. Çalışma kapsamında kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar 43
Tablo 9. Çalışma kapsamında hazırlanan ve kullanılan çözeltiler 45
Tablo 10. Real Time PCR ile kantitatif gen ekspresyon profillerine bakılan genler için primerlerin listesi.....53
Tablo 11. SYBR Green Real Time PCR protokolü.....54
Tablo 12. Bradford protein tayini deney protokolü.....55
Tablo 13. SDS Jel Elektroforezi için kullanılan ayırma jeli değerleri 56
Tablo 14. SDS-PAGE Jel Elektroforezi için kullanılan yükleme jeli değerleri 56
Tablo 15. Western Blot çalışması için kullanılan antikorlara ait bilgiler.....57
Tablo 16. TRXR1 enzim aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü.....59
Tablo 17. Vulpinik Asidin HeLa hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} (µg/mL) değerleri.....62
Tablo 18. Evernik asidin HeLa hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} (µg/mL) değerleri.....63
Tablo 19. Difraktaik asidin HeLa hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} (µg/mL) değerleri.....64
Tablo 20. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin HeLa hücre hattı üzerindeki erken, geç ve toplam apoptotik (%) ve nekrotik (%) değerleri 67
Tablo 21. Liken asitlerinin HeLa hücre hattı için belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarında uygulaması ile elde edilen total RNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri 71
Tablo 22. HeLa hücre hattı için belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda liken asitlerinin uygulaması ile elde edilen cDNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri 72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser Hücrelerinin Ayırt Edici Özellikleri....3
Şekil 2. Apoptozun İntrinsik ve Ekstrinsik Yolakları....5
Şekil 3. Metastaz Oluşum Basamakları....8
Şekil 4. Kadın Kanserlerinin İnsidans ve Mortalite Oranları....12
Şekil 5. Serviks Anatomisi....15
Şekil 6. Serviks kanseri için 2020'de bölgeye özgü insidans ve mortalitenin yaşa göre standartlaştırılmış oranları....16
Şekil 7. Servikal Intraepitelyal Neoplazilerin Progresyonu....20
Şekil 8. Serviks Kanserinin Progresyonu....20
Şekil 9. Kanser ve ROS Seviyeleri Arasındaki İlişki....30
Şekil 10. Tiyoredoksin Sisteminin Reaksiyon Mekanizması....31
Şekil 11. Tiyoredoksin Sisteminin Katalitik Döngüleri ve İşlevleri....32
Şekil 12. Hücre Sayımının Yapıldığı Thoma Lamı....48
Şekil 13. Western Blot Yönteminin Şematik Gösterimi....58
Şekil 14. Vulpinik Asidin HeLa Hücre Hattında, Hücre Canlılığına Etkisi....61
Şekil 15. Vulpinik asidin, HeLa hücre hattında 48 saatlik mumele sonucunda canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi. Ölçek: 100 µm. 62
Şekil 16. Evernik Asidin HeLa Hücre Hattında, Hücre Canlılığına Etkisi....62
Şekil 17. Evernik asidin, HeLa hücre hattında 48 saatlik mumele sonucunda canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi. Ölçek: 100 µm. 63
Şekil 18. Difraktaik Asidin HeLa Hücre Hattında, Hücre Canlılığına Etki....63
Şekil 19. Difraktaik asidin, HeLa hücre hattında 48 saatlik mumele sonucunda canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi. Ölçek: 100 µm. 64
Şekil 20. Annexin V FITC/PI Yöntemi ile Apoptotik Hücrelerin Analizi (örnek)....65
Şekil 21. Vulpinik Asidin HeLa Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Flow Sitometri ile Analizi....65
Şekil 22. Evernik Asidin HeLa Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Flow Sitometri ile Analizi....66
Şekil 23. Difraktaik Asidin HeLa Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Flow Sitometri ile Analizi....67
Şekil 24. HeLa kanser hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda vulpinik asit uygulanması sonucu transwell migrasyon analizi....68
Şekil 25. HeLa kanser hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda evernik asit uygulanması sonucu transwell migrasyon analizi....69

Şekil 26. HeLa kanser hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik asit uygulanması sonucu transwell migrasyon analizi.....70
Şekil 27. Vulpinik asidin, HeLa hücre hattında Bax, Bcl-2 ve TrxR1 genlerinin kantitatif ekspresyon profillerine ve Bax/Bcl-2 oranına etkisinin Real-Time PCR ile belirlenmesi 73
Şekil 28. Evernik asidin, HeLa hücre hattında Bax, Bcl-2 ve TrxR1 genlerinin kantitatif ekspresyon profillerine ve Bax/Bcl-2 oranına etkisinin Real-Time PCR ile belirlenmesi 74
Şekil 29. Difraktaik asidin, HeLa hücre hattında Bax, Bcl-2 ve TrxR1 genlerinin kantitatif ekspresyon profillerine ve Bax/Bcl-2 oranına etkisinin Real-Time PCR ile belirlenmesi. 75
Şekil 30. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin HeLa kanser hücre hattı ile muamele edildikten sonra TrxR1'in kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisinin western blot yöntemiyle gösterilmesi 76
Şekil 31. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin HeLa hücre hattında TrxR1 enzim aktivitesi üzerine etkisi. 77
Şekil 32. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin insan servikal kanser hücre hattı (HeLa)üzerine tiyoredoksin redüktaz 1 hedefli antikanser etkisi.. 86

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

ASC-H : HSIL dışlanmayan atipik skuamöz hücreler
ASC-US : Önemi belirsiz atipik skuamöz hücreler
BCL-2 : B hücreli lenfoma-2
BSA : Sığır serum albümini
CDK : Siklin bağımlı kinaz
CIN : Servikal intraepitelyal displazi
CO_2 : Karbondioksit
CT/BT : Bilgisayarlı tomografi
DALY : Disability Adjusted Life Years -Yetiyitimine Ayarlanmış Yaşam Yılları
DMSO : Dimetil sülfoksit
DNA : Deoksiribonükleik asit
EBRT : Eksternal beam therapy-Dış ışın radyoterapi
ECM : Ekstrasellüler matriks- hücre dış matrisi
EMT : Epitelyal mezenkimal geçiş
ErbB : Epidermal büyüme faktör reseptör
ESGO : European Society of Gynaecological Oncology-Avrupa Jinekolojik Onkoloji Derneği
EU : Enzim ünitesi
FGF : Fibroblast growth faktör
FIGO : The International Federation of Gynecology and Obstetrics-Uluslararası Kadın Hastalıkları ve Doğum Federasyonu
GLOBACAN : Global Cancer Observatory-Küresel Kanser Gözlemevi
HeLa : İnsan servikal kanser hücre hattı
HIF : Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HPV : İnsan papilloma virüsü
HSIL : Yüksek dereceli intraepitelyal lezyon
IARC : International Agency for Research on Cancer-Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IL : İnterlökin
IMRT : İntensity modulated radiation therapy-Yoğunluk ayarlı radyoterapi
Kaspaz : Sistein aspartik proteaz
LEEP : Loop elektrocerrahi eksizyon

LN	: Lenf nodu
LSIL	: Düşük dereceli intraepitelyal lezyon
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NCCN	: The National Comprehensive Cancer Network-Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
PAI	: Plazminojen aktivatör inhibitör
PARP	: Poli ADP-riboz polimeraz
PDGF	: Platelet kaynaklı growth faktör
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PI	: Propidyum iyodür
PTEN	: Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT	: Radyoterapi
SASP	: Yaşlanma ile ilgili salgı fenotipi
SCC	: Skuamöz hücreli karsinom
SCJ	: Skuamokolumnar bileşke
SD	: Standart sapma
SLN	: Sentinel lenf nodu biyopsisi
TGF	: Transforming growth faktörü
TNF	: Tümör nekroze edici faktör
TP53	: Tümor protein p53
Trx	: Tiyoredoksin
TrxR	: Tiyoredoksin redüktaz
VEGF	: Vasküler endotelyal growth faktör
WHO	: World Health Organization-Dünya Sağlık Örgütü

Simgeler

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
dk	: Dakika
g (RCF)	: Göreceli santrifüj kuvveti
g	: Gram
h	: Saat

IC_{50}	: Hücre canlılığını %50 azaltmak için gereken konsantrasyon
KDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saniye
µm	: Mikrometre
% (v/v)	: Hacimce 100 birim çözeltide bulunan çözünenin hacimce kesridir.
% (w/v)	: Hacimce 100 birim çözeltide bulunan çözünenin ağırlıkça kesridir.
%	: Yüzde

TEŞEKKÜR

Hayatımın önemli basamaklarından biri olan uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak beni yetiştiren, büyük bir sabır ve özveri ile tüm cerrahi ve bilimsel tecrübelerini paylaşan, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım; en başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Yakup KUMTEPE olmak üzere, Prof. Dr. Metin İNGEÇ, Prof. Dr. Bünyamin BÖREKÇİ, Prof. Dr. Ragıp Atakan AL'e;

Kliniğimize geldikleri günden itibaren eğitimimize verdikleri desteğin yanında bir abla samimiyeti ve sıcaklığıyla bize yaklaşan hocalarımız Doç. Dr. Emsal Pınar TOPDAĞI YILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Gamze Nur CİMİLLİ ŞENOCAK'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin oluşumundan tamamlanmasına kadar geçen süreçte, bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Ömer Erkan YAPÇA' ya;

İçerisinde bulunmaktan, beraber çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı bünyesinde bulunan tüm asistan arkadaşlarıma;

Kliniğe başladığım ilk günden itibaren hem iş hayatımda hem de özel hayatımda her zaman yanımda olan, varlığıyla daima bana güç veren kıymetli arkadaşım Uzm. Dr. Elif HİZAL'a

Özellikle bitirme süresince sabrını hiç kaybetmeyen, güler yüzüyle tüm işleri kolaylaştıran kıymetli sekreterimiz Hacer ÇALI'ya;

Kliniği aile ortamına çeviren, birlikte çalışmaktan her zaman zevk aldığım, bize her daim destek olan başta değerli hemşire ablalarım Esin GÖKÇEN, Gülnihal ÖZGEN, Kezban ÖNDER ve Aybüke AYDEMİR olmak üzere tüm hemşire, ebe ve sağlık personeline;

Tez çalışmamı proje olarak kabul eden ve maddi olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi, deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) ve tüm süreçlerde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümüne;

Hazırlanan bu tez çalışması süresince bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü bünyesinde görev alan çok değerli Dr. Şeyda Nur KALIN ve Doktora öğrencisi Şükran GÜNAYDIN'a;

Hayatımın her alanında olduğu gibi bu tez çalışmasında da bana rehberlik yapan, bilgi, birikim ve tecrübeleri ile her zaman ufkumu genişleten, maddi manevi her türlü desteği sağlayan canım abim saygıdeğer Prof. Dr. Harun Budak'a

Bu zorlu eğitim ve asistanlık hayatım boyunca her zaman yanımda olan, her konuda maddi manevi desteklerini esirgemeyen, varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, en başta saygıdeğer aile büyüğümüz rahmetli amcam Şevket BUDAK olmak üzere, Zeynep annem, babam, annem ve tüm aileme;

SONSUZ TEŞEKKÜR EDERİM.

ÖZET

İnsan Servikal Kanser Hücre Hattında (HeLa) Difraktaik, Evernik ve Vulpinik Liken Asitlerinin Tiyoredoksin Redüktaz 1 Hedefli Antikanser Etkisinin Araştırılması

Amaç: Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerin insan servikal kanser hücre hattı (HeLa) üzerindeki potansiyel anti-proliferatif, anti-migratif ve apoptotik etkilerini araştırmak ve sonrasında potansiyel antikanser etkisinin kanser araştırmalarında belirteç olarak kabul edilen tiyoredoksin redüktaz 1 (TrxR1) hedefli olup olmadığını belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: HeLa hücre hattı üzerinde bahsedilen liken asitlerinin sitotoksik etkisi, doz ve zaman bağımlı olarak XTT yöntemi ile incelendi ve her bir liken asidi için IC_{50} konsantrasyonları belirlendi. Bu liken asitlerinin apoptotik etkisi, hem flow sitometrik analiz ile hem de apoptotik yolak genlerinden Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarına Real Time PCR (qPCR) yöntemi ile bakılarak değerlendirildi. Migrasyon üzerine etkileri ise transwell migrasyon analizleri ile incelendi. Liken asitlerinin TrxR1'in gen ve protein ifadeleri üzerindeki kantitatif etkileri qPCR ve western blot yöntemleri ile, TrxR1 enzimatik aktivitesine etkisi ise DTNB yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: Sitotoksisite sonuçları; vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerin HeLa hücresinin proliferasyonunu zamana ve doza bağlı olarak baskıladığını gösterdi ve IC_{50} değerleri 66.53, 70.26 μg/ml ve 22.52 μg/mL olarak 48 saat olarak sırasıyla hesaplandı. Evernik ve difraktaik asidin HeLa hücre hattında apoptotik etkiye sahip olduğu ve üç liken asidinin de migrasyonu önemli derecede engellediği görüldü. Vulpinik ve evernik asit ile muamele TrxR1 ekspresyonunu arttırıken, difraktaik asit bir değişiklik göstermedi. Buna karşın üç liken asidinin de TrxR1 enzim aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği görüldü.

Sonuç: Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin HeLa hücre hattı üzerinde TrxR1 hedefli olarak antikanser etki göstermiştir. Bu üç liken asidinin serviks kanseri tedavisi için etkili ve potansiyel doğal terapötik ajan olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Serviks Kanseri, Liken Asidi, Terapötik Ajan, Tiyoredoksin Redüktaz 1, Ekspresyon

ABSTRACT

Investigation of Thioredoxin Reductase 1 Targeted Anticancer Effect of Diffractaic, Evernic, and Vulpinic Lichen Acids in Human Cervical Cancer Cell Line (HeLa)

Aim: The aim of this thesis is to investigate the potential anti-proliferative, anti-migratory, and apoptotic effects of vulpinic, evernic, and diffractaic lichen acids on the human cervical cancer cell line (HeLa). And then to determine whether the potential anticancer effect is targeted to thioredoxin reductase 1 (TrxR1), which is accepted as a marker in cancer research.

Materials and methods: The cytotoxic effect of the abovementioned lichen acids on the HeLa cell line was examined as dose and time-dependent by XTT method and IC_{50} concentrations were determined for each lichen acid. The apoptotic effect of these lichen acids was evaluated by both flow cytometric analysis and Real-Time PCR (qPCR) method by examining the expressions of the apoptotic pathway genes Bax and Bcl-2. The effects on migration were analyzed by transwell migration analysis. The effect of lichen acids on quantitative gene and protein expressions of TrxR1 was evaluated by qPCR and western blot methods, and the effect on TrxR1 enzymatic activity was investigated by the DTNB method.

Results: The cytotoxicity results indicated that vulpinic, evernic, and diffractaic lichen acids suppressed the proliferation of HeLa cells in a time and dose-dependent manner, and the IC_{50} values were calculated as 66.53 μg/mL, 70.26 μg/mL, and 22.52 μg/mL, respectively. It has been exhibited that evernic and diffractaic acids have apoptotic effects in the HeLa cell line and all three lichen acids significantly inhibit migration. While vulpinic and evernic acids increased TrxR1 expression, diffractaic acid did not show any change. On the other hand, it was observed that all three lichen acids inhibited TrxR1 enzyme activity significantly.

Conclusion: In conlusion, vulpinic evernic, and diffractaic lichen acids exhibited anticancer effects on the HeLa cell line targeted to TrxR1. It has been concluded that these three lichen acids may be effective and potential natural therapeutic agents for the treatment of cervical cancer.

Keywords: Cervical Cancer, Lichen Acid, Therapeutic Agent, Thioredoxin Reductase 1, Expression

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tedavisi ve bakımı oldukça zor ve maliyetli bir hastalık olan kanserin uzun süreli tedavi ve bakım süreci, hem hastayı hem de ailesi ve yakın çevresini etkilemektedir. Kanser, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2016 yılı son güncellemesinde, hastalık yükü ölçütü Disability Adjusted Life Years (DALY) sıralamasında ilk sırada yer alarak en büyük hastalık yükünü oluşturmaktadır. Aynı zamanda kanser ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında ikinci sırada yer almaktadır ve önümüzdeki kırk yıl içerisinde ise ilk sıraya gelmesi beklenmektedir (1,2). Kanser vakalarının bu denli yüksek hastalık yükü ve mortalite oranına sahip olması kanserle mücadelenin özel bir ilgi alanı olmasına; tanısı, tedavisi, önlenmesi ve koruyucu müdahalelerin geliştirilmesi ile alakalı çok sayıda çalışma yapılmasına sebep olmuştur.

Serviks kanseri, kadınlarda sık görülen kanserler ve kansere bağlı ölümler sıralamasında dünya genelinde dördüncü sırada yer almaktadır. Serviks kanserinin insidans ve mortalitesi bölgesel olarak farklılıklar göstermekte, 23 ülkede en sık teşhis edilen kanser ve 36 ülkede de kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni olduğu bilinmektedir. GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) 2020 verilerine göre, serviks kanserinde, dünyada tahmini 604.000 yeni vaka ve 342.000 ölüm görülmüştür (1,2).

Hemen hemen tüm kanser türlerinde tümör gelişimi ve ilerlemesini tetikleyen endojen ve eksojen kaynaklı yüksek oranda reaktif oksijen türleri (ROS) tespit edilmiştir (3,4). Reaktif oksijen türleri (ROS) hücresel metabolizma, çoğalma, farklılaşma ve anjiogenez gibi birçok temel hücresel olayda görev almakta, ayrıca hücre içi sinyal iletiminde ikincil haberciler olarak kullanılmaktadırlar (5–7). Hücrelerde seviyesinin artması ile oksidatif strese neden olarak hücresel fonksiyonları bozan ve birçok hastalığa neden olan ROS'ların hücre içi seviyeleri antioksidan sistemler tarafından elimine edilerek sürekli olarak korunmaktadır (8,9). Kanser hücreleri, yüksek ROS seviyelerinden dolayı yüksek düzeyde antioksidan aktivite gösterir ve ROS'un toksik düzeylere gelmesi engellenir (3,10). Bu redoks sisteminin kanser hücrelerinin büyüme, çoğalma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, anjiyogenez ve metastaz gibi kanserin her aşamasında rolü olduğu görülmüştür (11–13).

Tiyoredoksin sistem artan ROS seviyelerine karşı aktivitesi artarak hücresel redoks dengesini sağlayan en önemli enzimatik antioksidan sistemlerden biridir (14,15). Meme, serviks, akciğer, karaciğer ve mide kanseri gibi birçok kanserde hem tiyoredoksin (Trx) hem de tiyoredoksin redüktaz (TrxR)'ın aşırı eksprese olduğu ve tümör agresifliği arttıkça daha fazla eskprese edildiği görülmüştür (16–19). Literatüre bakıldığında birçok doğal ve sentetik

molekülün TrxR/Trx inhibisyou üzerinden antikanser özellikleri gösterilmiştir (15,20). Kanser tedavisinde kullanılan bazı kemoterapi ilaçlarının da etki mekanizmaları arasında TrxR inhibisyonun yer aldığı bilinmektedir. (21,22).

Servikal kanserlerin tedavisinde cerrahi genellikle erken evrelerde tercih edilirken kemoradyoterapi neredeyse tüm evrelerde tercih edilen tedavi yöntemidir (3,23). Serviks kanseri tedavisinde en sık tercih edilen kemoterapötik ajan sisplatinin, TrxR'yi etkili bir şekilde inhibe ettiği, ilacın sitotoksik etkilerini ve ilaca karşı gelişen direnci açıklayan önemli mekanizmalardan biri olduğu görülmüştür (24–29).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin yan etkilerinin görülmesi ve ilaca karşı direnç gelişmesi tedaviyi sınırlandıran en önemli faktörlerdir. Bu nedenle daha az yan etkiye sahip kanser hücrelerine spesifik olarak etki edecek ve ilaç direncine karşı yeni ilaçlar ve stratejilere ihtiyaç vardır (30,31). Doğal ürünler ve türevleri yeni antikanser ajanların geliştirilmesi için en önemli adaylardır (31–33). Doğal bir ürün olan likenler, yapıları birbirinden tamamen farklı bir mikrobiyont (mantar) ve bir fotobiyontun (alg veya siyanobakter, fotosentetik ortak) simbiyotik birlikteliğine sahip mikroorganizmalardır (34,35). Likenlerin biyoaktif sekonder metabolitleri olan liken asitlerinin antikanser özellikleri daha önce yapılan birçok çalışmada incelenmiştir (35–37). Özgencli ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan bir çalışmada, liken asitlerinden difraktaik, evernik ve vulpinik asidin TrxR üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Liken asitlerinin tamamı, özellikle de vulpinik asidin, TrxR üzerine güçlü bir inhibitör etki sergilediği hatta sisplatin ve doksorubisin gibi ticari antikanser ilaçlardan daha etkili olduğu gösterilmiş ve liken asitlerinin kanser tedavisi için TrxR hedefli potansiyel kemoterapötik ilaç olarak kullanılabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (38).

Bu tez çalışmasının amacı, serviks kanser hücre hattı (HeLa) üzerine difraktaik, evernik ve vulpinik liken asitlerinin antikanser etkisinin araştırılması ve bu etkinin kanser çalışmalarında markır olarak kabul edilen TrxR1 hedefli olup olmadığının gen ve protein seviyesinde araştırmaktır. Literatüre bakıldığında, sunulan projede kullanılacak liken asitlerinden sadece difraktaik asit ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinde canlılığın yüksek konsantrasyonlarda azaldığı gözlemlenmiştir (39). HeLa hücre hattı üzerine bu proje kapsamında belirtilen liken asitlerinin antikanser etkisinin ve bu etkinin tiyoredoksin sistem üzerinden olup olmayacağına ait yeterli bir çalışmanın literatürde olmaması sunulan bu tez çalışmasını özgün kılmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Ayırt Edici Özellikleri

Kanser, basit bir şekilde kontrolsüz hücre bölünmesi ve anormal hücre büyümesi olarak tanımlanan ve büyük bir kısmı DNA mutasyonlarının neden olduğu genetik bir hastalıktır. Ayrıca kanserlerde DNA metilasyonundaki fokal artışlar, histon modifikasyonundaki değişiklikler ve bunları düzenleyen genlerdeki mutasyonlar sonucunda meydana gelen epigenetik değişiklikler de mevcuttur. Bu genetik ve epigenetik değişiklikler hücrelerdeki büyüme, hayatta kalma, yaşlanma gibi temel süreçleri düzenleyen genlerin ekspresyonunda ve fonksiyonunda değişikliklere yol açar (40,41).

Kanser multifaktöryel bir hastalık olup, bakterilerden virüslere, çevresel faktörlerden yaşam şekline (sigara, alkol, yetersiz beslenme, kişisel hijyenin yetersiz olması, vb.), radyasyondan kalıtıma ve kimyasallara kadar birçok endojen ve ekzojen faktörler oluşumunda rol oynamaktadır (42–44). 120 den fazla türü vardır ve her bir kanser türü farklı transkriptomik ve proteomik içeriğe sahiptir. Bu sebeple kanser türlerinin morfolojileri, moleküler yapıları, yerleşim yerleri, büyüme ve yayılma hızları, tedavilere cevap verme şekilleri birbirlerine göre farklılıklar gösterir (45). Kansere karşı etkili ve spesifik tedavi edici, koruyucu, erken tanı ve tarama yöntemlerinin geliştirilmesi kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinin tanımlanmasına bağlıdır (46). Kanser hücrelerini, normal hücrelerden ayıran bazı temel özellikleri tanımlanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Kanser Hücrelerinin Ayırt Edici Özellikleri (11)

2.1.1. Proliferatif Sinyalleşmenin Sürdürülmesi

Normal dokular, kontrollü bir şekilde büyüme, çoğalma ve doku hemostazını devam ettirmek için büyümeyi teşvik eden ve büyümeyi inhibe eden sinyaller ile hücre döngüsünü sıkı bir şekilde kontrol eder. Bu sinyaller çoğunlukla hücre içi tirozin kinaz alanları içeren ve hücre yüzey reseptörlerini bağlayan büyüme faktörleri tarafından taşınır. Büyüme faktörleri hücrelerin büyüme ve çoğalma olaylarının başlamasında temel rol oynayan peptitlerdir. Büyümeyi destekleyen genler protoonkogenler, büyümeyi inhibe eden ve büyümenin gerektiğinde sınırlandırılmasını sağlayan genler ise tümör supresör (baskılayıcı) genlerdir (47).

Protoonkogenler (ErbB, Ras, Raf, Myc, CDK, vb.) hücrelerin sinyal ileti mekanizmasında (büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz vb.) görev alan birçok proteinin sentezinden sorumlu genlerdir (48,49). Büyüme faktörleri ve reseptörlerini kodlayan protoonkogenlerin mutasyonu büyüme faktörlerini onkogenik hale getirmektedir. Onkogenik dönüşüm ile hücre büyümesinin kontrol mekanizmaları bozulur ve kanser hücrelerinin kontrolsüz büyüme ve çoğalması ile sonuçlanır (50,51). Kanser hücrelerinde hücre döngüsünü kontrol eden siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve bunların düzenleyicilerindeki problemler, yapısal mitojenik sinyalleşme ve programlanmamış proliferasyona neden olur.

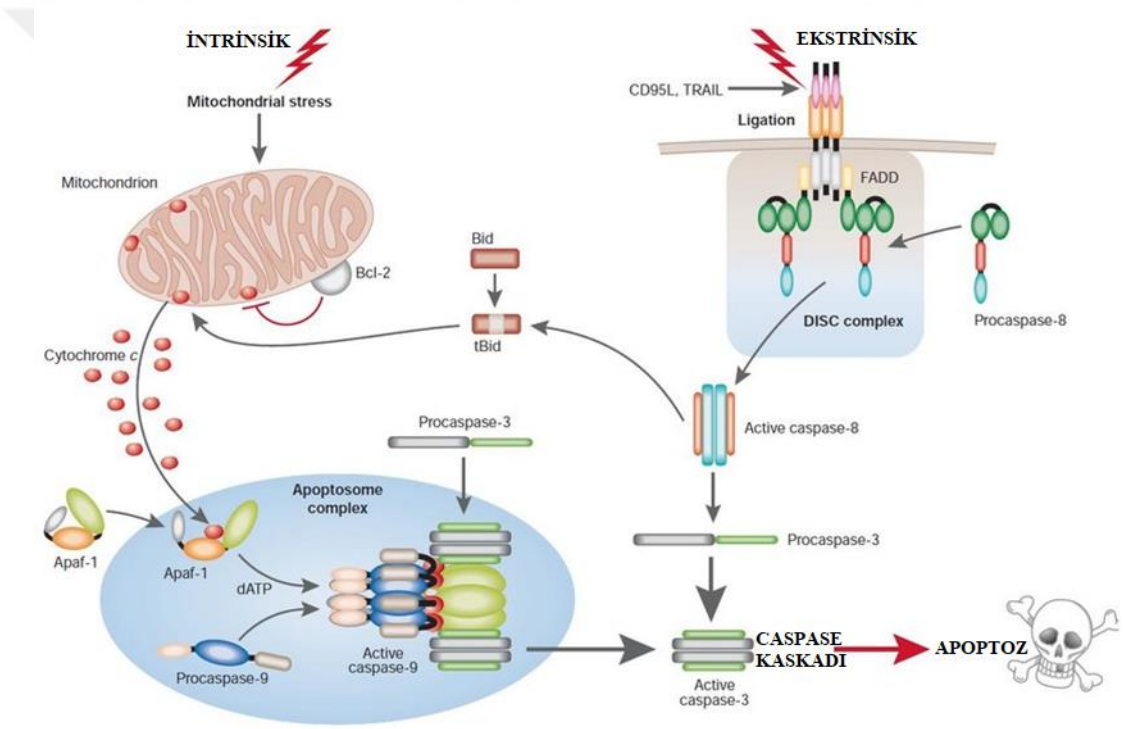
Kanser hücreleri büyüme faktörü ligandlarını kendileri sentezleyerek, ilgili reseptörlerin ekspresyonunu arttırarak otokrin bir mekanizmayla ve proliferatif sinyalleşmeyi azaltan negatif geribildirim mekanizmalarının bozulması ile ve diğer bazı mekanizmalarla hücre proliferasyonu sürdürebilir ve hücreler büyüme sinyalleri bakımından kendi kendine yeterlilik gösterirler (11).

2.1.2. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçmak

Tümör supresör genler (pRb, p53, p21, PTEN proteinlerini sentezleyen genler, CDK inhibitörleri) büyüme inhibitör yolunda görev alan proteinlerin sentezinden sorumlu genlerdir. Tümör supresör genlerin aktivasyonu sonucu oluşan büyüme baskılayıcı sinyaller ile hücre büyümesi ve çoğalması durdurulur. Kanser hücrelerinde gelişen bazı mutasyonlar sonucu bu genlerin inaktivasyonu ile kanser hücreleri büyümeyi inhibe eden sinyaller karşısında duyarsızlaşır ve büyüme baskılayıcalardan kaçarlar (11,52).

2.1.3. Hücresel Ölüme Direnç

Aşırı DNA hasarı oluşması ve hücre döngüsü kontrol noktalarında DNA hasarlarının onarımının başarısızlığı sonucu hücreler yaşlanmaya ve ölüme gidebilir (53). Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz birçok gen ile ilişkili bir sistemdir. Apoptoz ile hücre çoğalması kontrol edilir, doku hemostazı korunur, bazı zararlı ve gereksiz hücreler ortadan kaldırılır. Apoptoz mekanizmalarında bazı problemler kanser gibi birçok hastalığın ilerlemesine neden olur (54,55). Tüm apoptotik hücre ölümlerinin ortak noktası, proteinleri aspartik rezidülerinin ardından parçalayan sistein proteazlar olan kaspaz (caspase: cysteine aspartyl protease) aktivasyonudur. Kaspazların aktive edilebileceği üç yol vardır (Şekil 2). En sık tanımlanan iki başlatma yolu intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptör) yoludur.



Şekil 2. Apoptozun İntrinsik ve Ekstrinsik Yolakları (56)

İntrinsik yolda şiddetli oksidatif stres, hücre hasarı, büyüme sinyallerinin yokluğu gibi nedenlerle mitokondrinin dış zar geçirgenliği artar ve sitozole sitokrom-c gibi apoptoz başlatıcı moleküller salınır. Mitokondri dış zarının geçirgenliği mitokondriyal zar üzerinde bulunan BCL-2 (B-cell lymphoma-2) ailesi tarafından düzenlenir. BCL-2 protein ailesi, apoptozun düzenlenmesinde önemli rollere sahip pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden oluşur. Anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1 ve Mcl-1 gibi proteinler sitokrom-c nin mitokondriyal salınımını inhibe ederek, pro-apoptotik Bax, Bak, Bad, Bid, Bik, Bim ve Hrk gibi BH3 proteinleri sitokrom-c nin mitokondriyal salınımını indükleyerek

apoptozu düzenlerler. Hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli olan bu proteinlerin miktarı değil oranıdır (55,57,58). Ekstrinsik yol ölüm "ölüm reseptörleri" aracılığıyla aktive olur. Ölüm reseptörleri, tümör nekroze edici faktör (TNF) reseptörünün süper ailesi üyeleridir ve TRADD ve FADD gibi adaptör proteinleri ve kaspas-8 gibi sistein proteazları alan bir hücre içi ölüm alanına sahiptir. Ekstrinsik yol ölüm ligandlarının bir ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar (59). Sitokrom c' nin salınımı sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan bir kompleks (apoptozom) yoluyla kaspaz 3'ü aktive eder ve bu da ortak yol olarak tanımlanır (60).

Apoptozdan kaçış: Yüksek onkojenik sinyalleşme ve hiperproliferasyon ile ilişkili DNA hasarı apoptozu indükler. Kanser hücrelerinin gelişiminde ve apoptozda birkaç mekanizma temel rol oynar. Bunlardan en önemlisi DNA mutasyonlarına yanıt olarak BH3 proteinlerinin ekspresyonunu arttıran ve apoptozu indükleyen, kromozom 17'nin (17p13.1) kısa kolunda bulunan ve en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerden biri olan TP53 (p53) tümör proteinidir. Diğer mekanizma antiapoptotik faktörler tarafından dengelenemeyen onkoproteinler tarafından hiperaktif sinyalleşmeyi içerir (11). Kanser hücreleri, anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırararak, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri birçok kanserde gösterilmiştir) aradaki dengenin bozulması, kaspas fonksiyonlarının azlatılması ve ölüm reseptör sinyalinin bozulması gibi çeşitli mekanizmalarla apoptazdan kaçarlar (61,62).

Otofaji: Besin eksikliği ve hücresel stres durumlarında, hücresel fizyolojik bir yanıt olarak hücrelerin hayatta kalması için hücre içi hasarlı bazı molekül ve organelleri parçalayarak ortaya çıkan ürünleri biyosentez ve enerji metabolizmasında kullanan otofaji indüklenir (63). Tümör hücrelerinde erken dönemde otofaji onkogenezi baskılamak için koruyucu bir rol oynarken ilerleyen dönemlerde tümör hücrelerinin strese toleransını ve canlılığının devamını sağlayarak büyümesini destekler. Fakat pardoksal olarak birçok kanser hücresinde Beclin-1 in allelik kaybı gibi otofaji mekanizma bozuklukları bulunur (64,65).

Nekroz: Tümoral hücrelerde hücrelerin ölmekte olan hücreleri yok etme yeteneği yetersiz kalınca hücreler programlanmamış patolojik hücre ölümü olan nekroza giderler. Nekrotik hücreler şişer ve patlayarak içerdikleri hücre içi proteinleri dışarı bırakırlar. Bu sayede proinflamatuar sinyaller etrafa salınır. Bu proinflamatuar sinyaller sayesinde anjiyogenezi ve IL-1a gibi faktörlerle komşu canlı hücrelerin çoğalmasını uyararak tümör çoğalması ve metastazına yardımcı olduğu düşünülmektedir (11,66).

2.1.4. Replikatif Ölümsüzlüğün Sağlanması

Her hücre bölünmesinin sonunda telomerler kritik kısalığa ulaştığında yaşlanma (hücre büyümesinin geri döndürülemez şekilde durdurulması) ilişkili mekanizmalar devreye girer. Yaşlanma tümör oluşumunu baskılar ve hücrelerin ölüme gitmesine neden olur. İnsan kanser hücrelerinin büyük kısmında özel "telomeraz" adı verilen enzim önemli seviyelerde bulunmaktadır. Telomerazların bilinen enzim aktivitesi dışında, telomerden bağımsız hücre proliferasyonunu arttırdığı, apoptoza direnci arttırdığı, DNA hasar onarımı ve RNA polimeraz fonsiyonu olduğu de gösterilmiştir. Telomeraz ekspresyonu arttırılarak DNA korunur, tümör oluşumu devam ettirilir ve yaşlanma ve apoptozu tetiklemekten kaçınılır. Malignitelerin %85'inin telomeraz aktivitesi kazanma yoluyla sınırsız replikasyon yeteneği kazandığı ve %15'inin de is alternatif telomer uzaması ile telomer uzunluğunun korunduğu bilinmektedir (11,52,67). Bir taraftan da yaşlanan hücreler kemokinler, büyüme faktörleri ve proteazların yanı sıra sayısız proinflamatuar sitokinin güçlü salgılanmasını gerektiren yaşlanma ile ilişkili bir salgı fenotipini (SASP) oluşturur. SASP' ın yaşlanan hücre döngüsünü durdurması, tümorojenik hücrelerin immün aracılı temizlenmesi, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu gibi yararlı etkileri olduğu gibi, kronik enflamasyona teşvik etme, anjiyogenezi indükleme ve metastaza katkıda bulunma gibi zararlı etkileri de mevcuttur (68,69).

2.1.5. Anjiyogenez İndüksiyonu

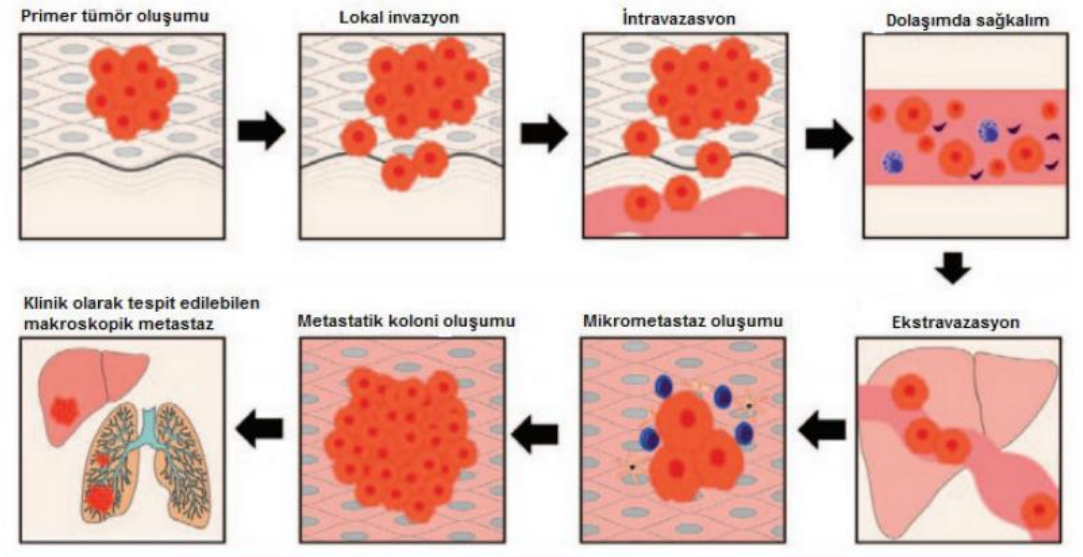
Önceden var olan damarlardan yeni kapiller damar oluşumu anjiyogenez (neovaskülarizasyon) olarak tanımlanır. Mevcut kan damarlarından yeni damarların oluşumu karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir (70). Anjiyogenez vasküler ağların genişlemesi ve şekillenmesi için embriyonik dönemde, yara iyileşmesinde, menstural siklusta ve kronik inflamasyon gibi birçok yerde da karşımıza çıkmaktadır (71).

Anjiyogenez pro-anjiyogenik (VEGF, bFGF, TGF-α, PDGF, vb.) ve anti-anjiyogenik (trombospondin, anjiyostatin, endostatin, vb.) faktörler tarafından düzenlenir. Malignitelerde pro-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunun artması ve anti-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunun inhibisyonu ile anjiyogenez artar (72,73). Kanserlerin 1-2 mm'yi aşabilmesi için anjiyogenezi indüklemeleri gerekmektedir. Artan anjiyogenez hem hücrelerin besin ve oksijen ihtiyacını karşılayarak hem de büyüme faktörlerini uyararak hücrelerin büyüme ve çoğalmasını sağlarlar. Kanserlerde artan anjiyogenezde atipik vasküler yapılanma: erken ve aşırı dallanma gösteren kıvrımlı damarlar, anormal kan akımı, mikrokanamalar, artmış endotel hücre proliferasyonu ve apoptoz izlenir (11,52).

Anjiyogenezin en önemli indükleyicisi hipoksidir ve oksijenin ana düzenleyicisi olan hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF-1) tarafından düzenlenir. Anjiyogenezin diğer indükleyicileri anjiyogenezi düzenleyen genlerdeki değişiklikler, mekanik stres ve inflamasyondur. HIF-1 anjiyogenezin yanında proliferasyon, metabolizma, metastaz ve farklılaşma dahil olmak üzere tümörogenezin birçok basamağında yer alır. HIF-1, VEGF reseptörleri, PAI-1, anjiyopoietinler ve trombosit dahil olmak üzere birçok pro-anjiyojenik faktörün eskpresyonunu arttırır. Hipoksinin yanı sıra onkogenler, sitokinler, proanjiyogenik büyüme faktörleri ve hormonlar da anjiyogenezde en önemli role sahip VEGF üretimini uyarırlar (52,70).

2.1.6. İnvazyon ve Metastaz Aktivasyonu

Kanser hücrelerinin büyük kısmında görülen ve kanser hücrelerini benign tümörlerden ayıran en önemli özellikleri invazyon (çevreleyen dokuyu istila etme) ve uzak organlara yayılım olarak bilinen metastazlardır (74). Lokal invazyondan, makroskopik metastaza kadar olan metastaz oluşum basamakları şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Metastaz Oluşum Basamakları (75)

İnvazyon ve metastaz için kanser hücreleri öncelikle bazal membran ve stromal hücreleri de içeren hücre dış matrisi (ekstraselüler matrix: ECM) istila ederler ve tümöral hücreler damar sistemine intravaze olurlar. Dolaşıma geçen kanser hücreleri integrin gibi moleküllerde yaptıkları değişiklikler ile dolaşımda varlıklarını sürdürebilirler ve doku faktörü, selektinler, trombin, katepsin B gibi faktörler salgılayarak trombosit agregasyonunu uyarıp kendilerine trombosit kalkanı oluşturarak immün sistemden kaçarlar (76,77). Dolaşımdaki

tümör hücreleri, ilgili organların damar sistemine ulaştıklarında lümen içinde büyüyerek mikrokoloni oluştururlar ve bu mikrokoloniler damar duvarını delerek parankim dokuya ulaşırlar. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin endoteli aşıp organlara ulaşması ekstravazasyon olarak adlandırılır. Ekstravazasyonda integrinler, selektinler gibi hücre adezyon molekülleri gibi hücreler arası bağlantılar anahtar rollere sahiptir. Organ parankimine ulaşan bu mikrokoloniler burada makrokoloni oluştururlar ve klinik olarak tespit edilebilen makroskopik metastazlara dönüşebilirler (78,79).

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) lokal invazyonda temel olaydır ve bazı transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenir. EMT sürecinin en önemli mekanizması E-kaderin ekspresyonunun kaybolmasıdır. E-kaderin ekspresyonunda kaybolma bazal membran ve ECM'nin parçalanması sonucu matris metalloproteinazlar, katepsin D ve ürokinaz gibi plazminojen aktivatörü enzimlerin salınmasına ve kemotaktik ve anjiyogenik fragmanların oluşmasına neden olur. Böylece intravazasyon başlar. Kanser hücrelerinin perisit ve endotel bariyerini aşması TGF-β ve VEGF gibi moleküller aracılığıyla kolaylaştırılır ve hızlanır (52,77). EMT ile bazı hücreler invazyon yapma, apoptozise direnme ve yayılım gibi özellikler kazanırlar (80). Metastatik alanda daha önceden gerçekleşen EMT tersine dönerek mezenkimal-epitelyal dönüşüm gerçekleşir ve bu dönüşüm tümör hücrelerinin çoğalarak organlarda makro koloni oluşturmalarını sağlayan mekanizmadır (77).

Yapılan son çalışmalarda kanserlerin ayırt edici diğer özellikleri olarak;

- Enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi (warburg etkisi)
- Tümör çevresi inflamasyon/tümör mikroçevresi
- İmmün yanıttan kaçış
- Genetik instabilite ve mutasyon gibi yeni özellikleri de tanımlanmıştır (11).

2.2. Kanser Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2016 yılı son güncellemesinde nedene özgü Yetiyitimine Ayarlanmış Yaşam Yılları (Disability Adjusted Life Years - DALY) olarak tahmin edilen ilk 20 hastalık yükü sıralanmıştır. DALY hastalıkların, ölümle sonuçlanmayan fakat uzun süreli engellilik ve işlev kaybına neden olan hastalık yükü ölçütünü değerlendirir. WHO'ya göre dünya genelinde kanserler 244.6 milyon DALY ile en büyük hastalık yükünü oluşturmaktadır. Kanserleri ikinci sırada iskemik kalp hastalığı ve üçüncü sırada ise inme (felç) izlemektedir (Tablo 1) (1).

Tablo 1. Genel popülasyonda ve kadınlarda DALY'ler olarak tahmin edilen ilk 5 hastalık

Hastalık	Genel			Kadınlar		
	DALY †	Yüzde (%)	Sıra	DALY †	Yüzde (%)	Sıra
Toplam	2668.47	100	-	1238.78	100	-
Kanserler	244.574	9.2	1	107.135	8.6	1
İskemik kalp hastalığı	203.700	7.6	2	83.945	6.8	2
İnme	137.941	5.2	3	65.031	5.2	3
Alt solunum yolu enfeksiyonu	129.690	4.9	4	62.148	5.0	4
Erken doğum komplikasyonu	101.397	3.8	5	45.779	3.7	5

2016 yılındaki son WHO güncellemesinde hastalıklara bağlı ölümlerinin ilk 20 nedeni sıralamıştır. İskemik kalp hastalığı dünya çapında 9.43 milyon ölümle önde gelen ölüm nedeni olmaya devam ederken, bunu ikinci sırada kanser (8.97 milyon ölüm) ve üçüncü sırada inme (5.78 milyon ölüm) izlemektedir (1).

Tablo 2. Dünya genelinde 2000 ve 2016 yıllarında önde gelen 5 ölüm nedeni (1)

Hastalık	2016			2000		
	Ölümler	Sıra	Yüzde (%)	Ölümler	Sıra	Yüzde (%)
Toplam	56.874		100	52.307		100
İskemik kalp hastalığı	9.433	1	16.6	7.029	1	13.4
Kanserler	8.966	2	15.8	7.010	2	13.4
İnme	5.781	3	10.2	5.170	3	9.9
KOAH	3.041	4	5.3	2.972	5	5.7
Alt solunum yolu enfeksiyonları	2.957	5	5.2	3.325	4	6.4

Genel olarak, dünya çapında kanserlerin insidans ve mortaliteleri hızla artmaktadır; bu durum nüfusun büyümesi, yaşlanması, birçok çevresel faktör ve yaşam tarzı ile ilişkili olan kanser risk faktörlerinin yaygınlığı ve dağılımındaki değişikliklere bağlanmaktadır (81). Önümüzdeki kırk yılda kanser ölümlerinin, 2060 yılına kadar 2.08 kat (iskemik kalp hastalığındaki artış için 1.76 kat) artışla iskemik kalp hastalığına bağlı ölümlerin önüne geçmesi beklenmektedir (1).

GLOBOCAN 2020 verilerine göre 2020'de dünyada tahmini 19.3 milyon yeni vaka ve 9.9 milyon kanser ölümü vardı. Bunlardan en sık görüleni 2.3 milyon (%11.7) ile meme kanseri ve kansere bağlı ölümlerinin en sık nedeni ise akciğer kanseridir (%18) (Tablo 3).

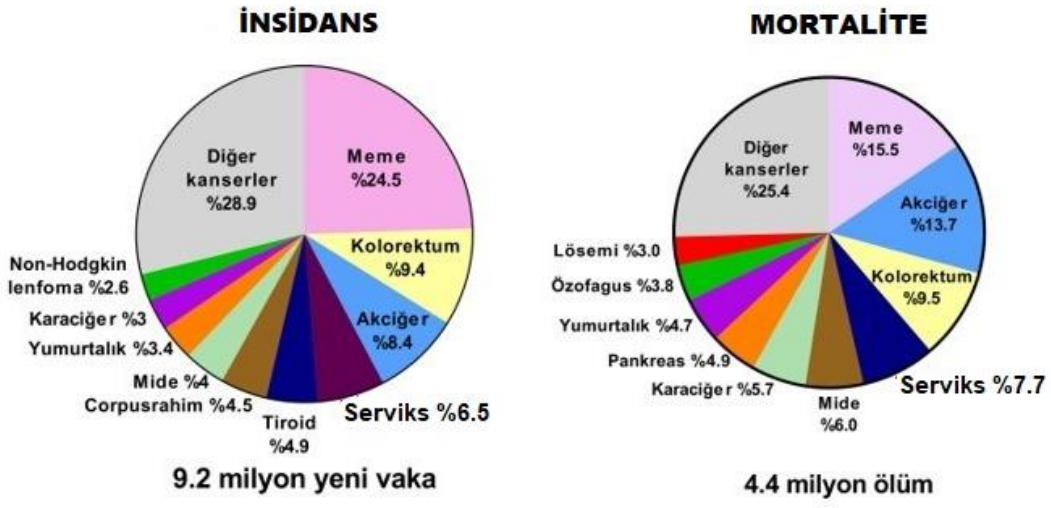
Tablo 3. 2020 yılında 36 kanserde yeni vaka ve ölümlerin sayısı (2)

Kanser Bölgesi	Yeni Vakaların Sayısı (%'si)		Yeni Ölümlerin Sayısı (%'si)	
Meme	2.261.419	(11.7)	684.996	(6.9)
Akciğer	2.206.771	(11.4)	1.796.144	(18.0)
Prostat	1.414.259	(7.3)	375.304	(3.8)
Derinin melanom olmayan kanserleri	1.198.073	(6.2)	63.731	(0.6)
Kolon	1.148.515	(6.0)	576.858	(5.8)
Mide	1.089.103	(5.6)	768.793	(7.7)
Karaciğer	905.677	(4.7)	830,180	(8.3)
Rektum	732,210	(3.8)	339.022	(3.4)
Serviks	604,127	(3.1)	341.831	(3.4)
Özafagus	604,100	(3.1)	544.076	(5.5)
Tiroid	586.202	(3.0)	43.646	(0.4)
Mesane	573.278	(3.0)	212,536	(2.1)
Hodgkin olmayan lenfoma	544.352	(2.8)	259.793	(2.6)
Pankreas	495.773	(2.6)	466.003	(4.7)
Lösemi	474.519	(2.5)	311.594	(3.1)
Böbrek	431.288	(2.2)	179.368	(1.8)
Korpus Uteri	417.367	(2.2)	97.370	(1.0)
Dudak, ağız boşluğu	377.713	(2.0)	177.757	(1.8)
Deri melanomu	324.635	(1.7)	57.043	(0.6)
Over	313.959	(1.6)	207.252	(2.1)
Beyin, sinir sistemi	308,102	(1.6)	251.329	(2.5)
Larinks	184.615	(1.0)	99.840	(1.0)
Multipil myeloma	176.404	(0.9)	117.077	(1.2)

Nazofarenks	133.354	(0.7)	80,008	(0.8)
Safra kesesi	115.949	(0.6)	84.695	(0.9)
Orofarenks	98.412	(0.5)	48,143	(0.5)
Hipofarenks	84.254	(0.4)	38.599	(0.4)
Hodgkin lenfoma	83.087	(0.4)	23.376	(0.2)
Testis	74.458	(0.4)	9334	(0,1)
Tükürük bezleri	53.583	(0.3)	22.778	(0.2)
Anüs	50.865	(0.3)	19.293	(0.2)
Vulva	45.240	(0.2)	17.427	(0.2)
Penis	36.068	(0.2)	13.211	(0,1)
Kaposi sarkomu	34.270	(0.2)	15.086	(0.2)
Mezotelyoma	30.870	(0.2)	26.278	(0.3)
Vajen	17.908	(0,1)	7995	(0,1)
Tüm Kanserler	**19.292.789**		**9.958.133**	

2.2.1. Kadınlarda Kanser Epidemiyolojisi

Kadınlarda en sık görülen dört kanser; meme, kolorektal, akciğer ve serviks kanserleridir. Kadınlarda mortalite oranı en yüksek dört kanser; ise meme, akciğer, kolorektal ve serviks kanserdir (Şekil 4).



Şekil 4. Kadın Kanserlerinin İnsidans ve Mortalite Oranları (2)

2.3. Kanser Tedavisi

Her bir kanser türü farklı transkriptomik ve proteomik içeriğe sahiptir, bu nedenle kanserlerin tedaviye cevap verme şekilleri birbirine göre farklılıklar göstermektedir ve tek bir kesin tedavi yönteminden bahsetmek doğru değildir. Kanserin tedavisinde kullanılan temel yöntemler cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi olmakla beraber hormon terapisi, gen tedavisi, biyolojik tedavi, immunoterapi gibi diğer tedavi yöntemleri de mevcuttur. Bu tedavi yöntemleri tek başına veya destek tedavi olarak diğer tedaviler ile birlikte kullanılabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları mevcuttur (45,82).

2.3.1. Cerrahi

Cerrahi, çoğu kanserin tanısında, tedavisinde veya palyatif amaçlı olarak kullanılabilir. Kanserin histopatolojik tanısı için biyopsi, şüpheli dokudan iğne veya açık cerrahi teknikle örnek alınması ve ardından çıkarılan hücrelerin mikroskop altında incelenmesi gerekmektedir. Kanserin erken evrelerinde primer tümörün cerrahi rezeksiyonu bölgesel kontrolü sağlar ve adjuvan kemoradyoterapi ile birleştirildiğinde kanser tedavisinde önemli sonuçlar verir. Cerrahi tedavi erken evre veya lokal olarak ilerlemiş kanser için yapıldığında daha etkili ve daha az maliyetli bir tedavi yöntemidir. İleri evre kanserlerde daha az rolü vardır, seçilmiş vakalarda palyatif amaçlı yaşam kalitesinin arttırılması ve yaşam süresinin uzamasını sağlayabilir (83,84).

2.3.2. Kemoterapi

Alman kimyager Paul Ehrlich bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için ilaçlar geliştirmeye başlamış ve hastalıkları tedavi etmek için kimyasalların kullanımı olarak "kemoterapi" terimini 1900'lerin başında tanımlamıştır (85). Kemoterapinin amacı, kanserli hücreleri öldürmek, hücrelerin büyüme ve çoğalması, invazyon ve metastazını engellemektir. Kemoterapi tek başına veya diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılabilir ve birden fazla ilaç kombinasyonunun tek bir ilaç kullanımından yan etkileri daha fazla olmasına rağmen daha etkili tedavi olduğu bilinmektedir (82). Kemoterapinin dezavantajı kanserli hücrelerle birlikte normal hücrelere de etki göstermesi ve toksik etkilerin ortaya çıkmasıdır (86).

2.3.3. Radyoterapi

Almanya'dan Wilhelm Conrad Röntgen 1895'te X-ışınlarını keşfetmiştir ve bundan kısa bir süre sonra da kanser tedavisinde iyonlaştırıcı radyasyon uygulanmış, dikkate değer

sonuçlar elde edilmiştir. Radyoterapi (RT) kanser hücrelerindeki DNA'ya zarar verir, hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını durdurur, kanser hücrelerinin ölmesine neden olur (83,87). Genellikle lokalize kanserleri tedavi etmek, lokal ilerlemiş veya metastatik kanserlerde semptomlarda rahatlama sağlamak için palyatif amaçlı kullanılabilir. RT tek başına, preoperatif veya postoperatif olarak cerrahi tedavi veya kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanılabilir (83). Radyoterapiye bağlı yan etkiler, uygulandığı bölgeye göre çeşitlilik gösterir. Yan etkiler genellikle akut olarak ortaya çıkar ve uygulanan bölgede ödem ve irritasyona neden olmaktadır (88,89). Radyoterapi dış ışın radyasyon tedavisi (EBRT: Eksternal beam therapy), brakiterapi ve radyoizotop olarak üç şekilde uygulanabilir (87).

2.3.4. İmmünoterapi

İmmünoterapi, vücudun doğal savunma mekanizmasını devreye sokarak kansere karşı güçlendirerek kanserli hücreleri bulma ve öldürme yeteneğini artırır. Bunu da antikorlar sayesinde gerçekleştirir ve bu antikorlar kanser hücrelerindeki anormal proteinlerin ve spesifik genlerin aktivitesini durdurarak hedefe yönelik etki gösterirler. Bu antikorlar laboratuvar ortamında üretilebilir (monoklonal antikorlar) ve insan vücuduna enjekte edilebilirler. İmmünoterapi genellikle diğer kanser tedavileriyle birlikte kullanılır (87,90).

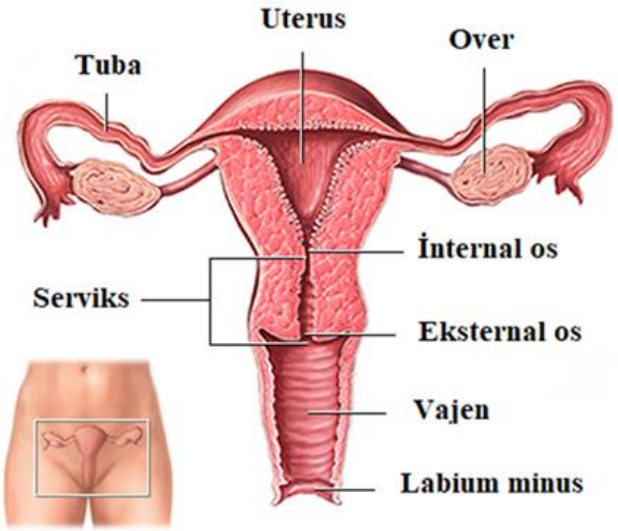
2.3.5. Gen Tedavisi

Gen tedavisinde amaç, mutasyona uğramış anormal genleri düzeltmek için kanserli hücrelere nükleik asitler verip mutasyona uğramış genleri normal genlerle değiştirerek kanseri tedavi etmektir. Genetik materyali taşımak için genellikle virüsler kullanılmaktadır (87,91).

2.4. Serviks Kanseri

2.4.1. Serviks Anatomisi

Serviks, uterusun en alt kısmında 3-4 cm uzunluğunda ve 2.5-3.5 cm çapında silindirik yapıdadır (Şekil 5). Kadının yaşına, doğum sayısına ve hormonal durumuna bağlı olarak büyüklüğü ve şekli değişiklik gösterebilir (92). Serviks vajene eksternal os ile uterusa ise internal os ile bağlanır. Eksternal osun dış kısmını oluşturan alana ekstoserviks denir ve skuamöz epitel ile döşelidir. Eksternal osun yukarısında daha iç kısımdaki alana ise endoserviks denir. Endoservikal kanal ise internal ostan eksternal osa uzanan uterus ile vajeni biribirine bağlayan yapıdır ve kolumnar epitel ile döşelidir. Bu iki epitelin karşılaştığı alana skuamokolumnar bileşke (SCJ) denir (23,93).



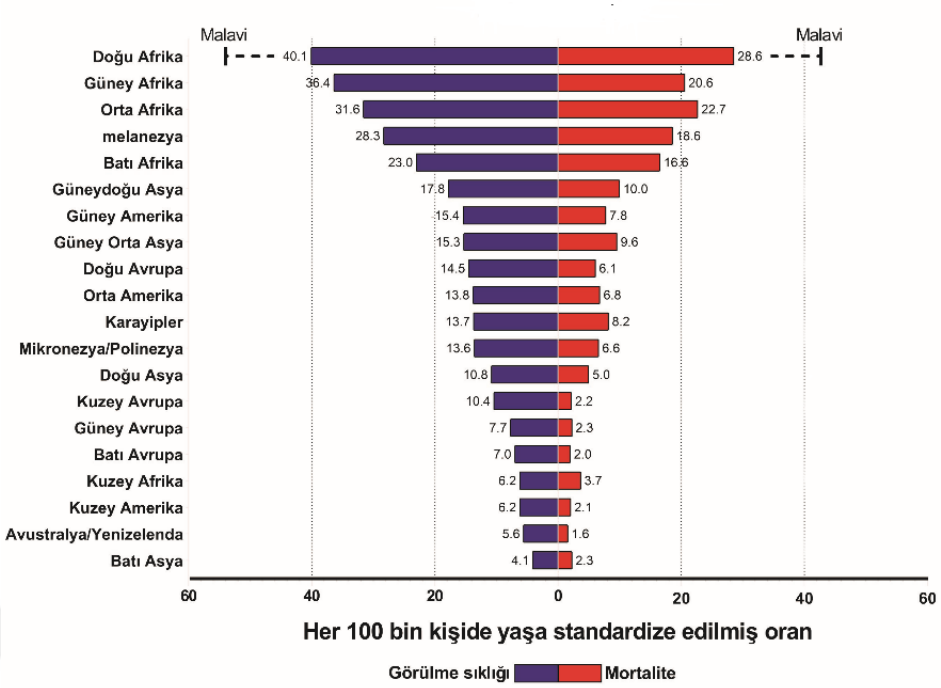
Şekil 5. Serviks Anatomisi(94)

SCJ ergenlik, gebelik, menopoz ve hormonal uyarı ile değişebilen bir alandır. Metaplazi orijinal skuamokolumnar bileşkeden içeri eksternal osa doğru ve kolumnar vülluslar üzerinden gelişir. Bu metaplazik değişimlerin olduğu alana transformasyon zonu denir ve hemen hemen tüm servikal kanserler transformasyon zonundan başlar (95). Ektoservikste ortaya çıkan tümörler, çoğunlukla invaziv servikal karsinom vakalarının yaklaşık %75'ini oluşturan skuamöz hücreli karsinomlardır. Aksine, endoserviksten kaynaklanan tümörlerin adenokarsinom olma olasılığı daha yüksektir (96).

2.4.2. Serviks Kanseri Epidemiyolojisi

Serviks kanseri kadınlarda sık görülen kanserler ve kansere bağlı ölümler sıralamasında dünya genelinde dördüncü sırada yer almaktadır Globocan 2020 verilerine göre kadınlarda dünyada tahmini 604.000 yeni vaka ve 342.000 ölüm görülmüştür (Tablo 3).

Serviks kanserinin insidans ve mortalitesi bölgesel olarak farklılıklar göstermektedir. Serviks kanseri 23 ülkede en sık teşhis edilen kanserdir ve 36 ülkede kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir. Bu ülkelerin büyük çoğunluğu Afrika, Melanezya, Asya Güney Amerika gibi sosyoekonomik düzeyi düşük ülkelerdir. Sahra altı Afrika en yüksek bölgesel insidans ve ölüm oranına sahip bölgedir (Şekil 6).



Şekil 6. Serviks kanseri için 2020'de bölgeye özgü insidans ve mortalitenin yaşa göre standartlaştırılmış oranları (2,97).

Son yıllarda dünyanın çoğu bölgesinde, artan ortalama sosyoekonomik düzey, genital hijyene dikkat edilmesi, paritede azalma, sitolojik tarama programlarının ve insan papilloma virüsü (HPV) aşılarının uygulanmasına bağlı olarak serviks kanserinin insidans ve mortalite oranlarında azalma izlenmiştir (98,99). Ülkemizde seviks kanseri, kadınlarda sık görülen kanserler arasında dokuzuncu sırada yer alarak dünya sıralamasının altında seyretmektedir. Dünya genelinde en sık görülen jinekolojik kanser serviks kanseri iken ülkemizde endometrium ve over kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (97,100).

2.4.3. Serviks Kanseri Risk Faktörleri

Serviks kanseri için en önemli risk faktörü HPV enfeksiyonudur. Direk HPV ilişkili olmayan servikal kanser risk faktörleri ise: düşük sosyoekonomik durum, oks kullanımı, sigara kullanımı ve genetiktir (101–103). HPV, dünya genelinde her iki cinsiyet için de cinsel yolla bulaşan hastalıkların en sık nedenidir (104) ve genellikle cinsel yolla bulaşmasına rağmen ciltten cilde temas yoluyla, paylaşılan kontamine giysilere uzun süre maruz kalınması ve fomitler yoluyla cinsel olmayan bulaş şekilleri de mevcuttur (105). Kişinin cinsel aktif hayata erken yaşta başlaması, birden fazla cinsel partnerinin olması, cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsünün bulunması, ilk doğumun erken yaşta yapılması ve artan parite, HPV bağlı başka kanser öyküsünün bulunması ve immünosupresyon durumları (HIV gibi) HPV bulaş riskini daha da arttırır (104).

Genomik farklılıklar gösteren 200'den fazla HPV türü tanımlanmıştır. HPV türleri siğiller, solunum yolu papillomatözü, bazı cilt lezyonları gibi benign hastalıklara ve serviks, vulva, vajen, anüs, penis ve orofarenks kanserleri gibi malign hastalıklara neden olabilirler (104,106). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) bazı HPV tiplerini (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) kanserlerle yakından ilişkili bulmuş ve yüksek riskli (HR)-HPV'ler olarak sınıflandırmıştır. En yüksek riskli olanları HPV-16, 18, 31, 33, 45 olarak belirlemiştir. Genellikle benign hastalıklardan izole edilen düşük riskli (LR)-HPV tipleri 6, 11, 42, 43, 44 olarak ve anogenital bölge enfeksiyonlarında, genital siğillerde en sık izole edilen HPV tip-6 ve 11 ise en düşük riskli HPV tipleri olarak belirlenmiştir (107,108).

Kadınların %80'den fazlasına hayatları boyunca en az bir HPV türünün bulaşması beklenmektedir. Tüm bu HPV enfeksiyonlarının %90'ı 2 yıl içinde vücuttan temizlenip atılsa da %10'unun kalıcı hale gelerek kadınlarda prekanseröz servikal lezyonlara neden olabiliceği bilinmektedir (23). Serviks kanseri genellikle yüksek riskli HPV türlerinden birinin alt genital sisteme kalıcı olarak yerleşmesinin uzun vadedeki (10-15 yıl) bir sonucu olarak gelişmektedir. Servikal skuamöz hücreli kanserlerin %99,7'sinde HPV enfeksiyonu suçlanmış, HPV tip 16 ve 18 dünya genelinde servikal kanserlerin %70'inden sorumlu tutulmuştur ve en onkojenik tipler olarak belirlenmiştir (109,110). Servikal adenokanserlerde ise HPV prevalansının yaşa bağlı olarak değişmekte olduğu görülmüştür. 40 yaş altı servikal adenokanserli kadında %89 HPV bulunurken, 60 yaş ve üzeri kadında ise HPV sadece %43 oranında görülmüştür (111). HPV prevalansı 25 yaşından küçük kadınlarda %25 ile en yüksek prevalansa sahiptir (23). Ülkelere göre prevalans %2 ile %42 arasında değişiklik göstermektedir. En yüksek bölgesel prevalans oranı %24 ile Sahra Altı Afrika'dır (112).

Ülkemizde 2018 yılında Pamukkale Üniversitesinde yapılan bir çalışmada polikliniğe başvuran 1170 hasta değerlendirilmiş ve hastaların %37.2'sinde HPV enfeksiyonu saptanmıştır (Yüksek riskli HPV oranı %21.2, orta riskli HPV oranı %6.4, düşük riskli HPV oranı %9.5). HPV prevalansı en fazla 17-30 yaş arasında, yüksek riskli HPV ler ise en sık 51-60 yaş arasında saptanmıştır. HPV tiplerinden ise en yüksek %8.9 ile HPV 16 tespit edilmiştir (102,113).

Serviks kanserinde HPV enfeksiyonu HPV DNA ve kapsid antijeni içerir ve hücrelerde öncelikle koilositik değişikliklere neden olurlar. Daha sonra HPV DNA parçaları konak hücreye entegre olur ve E6, E7 onkoproteinlerinin ekspresyonu ile malign dönüşüm başlar (114).

2.4.4. Serviks Kanserinin Erken Tespiti ve Önlenmesi

Servikal kanserli hastaların ortalama tanı yaşı 51'dir ve 35-59 yaş ve 60-64 yaşlarında olmak üzere iki pik yaş aralığı mevcuttur. Smear yaptırmamış kadınlarda hayatları boyunca serviks kanserine yakalanma riski 1/100'dür (115).

WHO, HPV ilişkili hastalıkları küresel halk sağlığı sorunu olarak kabul ederek HPV aşılarının ulusal bağışıklama programlarına dahil edilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Serviks kanseri HPV ilişkili tüm kanserlerin %84'ünü oluşturmaktadır. HPV tip 16 ve 18'e karşı geliştirilen aşıların 24-45 yaş arasındaki kadınlarda serviks premalign lezyonları ve serviks kanseri riskini önemli oranda azalttığı gösterilmiştir (116). HPV aşıları serviks kanserinin önlenmesinde birincil müdahaledir (117). HPV tiplerinin neden olduğu serviks, vulva, vajen ve anüsu etkileyen premalign lezyonların ve kanserlerin önlenmesi için 9 yaşından itibaren HPV aşıları hem kadınlara hem de erkeklere uygulanabilmektedir. HPV aşıları için birincil hedef grubu 9-14 yaş arası kız ve erkek çocuklarının 0 ve 6-12. aylarda olmak üzere iki doz aşılanması, ikincil hedef grubu ise 15 yaş ve üzerindeki kız ve erkek çocuklarının 0, 1 ve 6. aylarda olmak üzere üç doz aşılanmasıdır (23,117). Üç çeşit HPV aşısı bulunmaktadır:

1. HPV 16 ve HPV 18'i hedefleyen ikili (bivalan) aşı,
2. HPV 16, HPV 18, HPV 6 ve HPV 11'i hedefleyen dörtlü (kuadrivalan) bir aşı,
3. HPV 6, 11, 16 ve 18'e ek olarak HPV tip 31, 33, 45, 52 ve 58'i hedefleyen bir dokuzlu (nanovalan) aşı.

Servikal lezyonların taranması ve tespiti serviks kanserinin küresel olarak kontrolünde önemli bir yere sahiptir. Birincil müdahale olan HPV aşıları serviks kanserini önlemeyi amaçlarken, tarama ise servikal prekanseröz lezyonların erken tespitini, invaziv serviks kanserini ve serviks kanserine bağlı ölüm oranlarını azaltmayı amaçlamaktadır (23). Ülkelerin serviks kanseri tarama stratejileri farklılık göstermektedir. Öncelikle hangi yaş gurubunun taranacağı, hangi maliyet etkin tarama testinin kullanılacağı, tarama sıklığının nasıl olacağı, hedef guruba nasıl ulaşılacağı ve tarama pozitif kadınların yönetiminin nasıl olacağının net bir şekilde ifade edildiği kılavuzlar yayınlanmalıdır.

Kullanılan tarama yöntemleri: geleneksel sitoloji (pap smear), sıvı bazlı sitoloji, HPV testi ve asetik asit ile görsel inceleme (VIA)'dir. Hem pap smear hem de HPV tabanlı tarama programlarının servikal lezyonların erken tespiti ve tedavisinde etkili olduğu görülmüştür (118). Pap smear genellikle HPV'nin servikste neden olduğu hücresel değişiklikleri manuel olarak inceleyen bir tarama yöntemidir. Bu tarama yönteminde yaklaşık %8 yetersiz numune, %20-30 yanlış negatif sonuçlar gelmektedir ve bu oranların azaltılması için hücrelerin

sabitlendiği, hücresel yapının daha iyi korunduğu sıvı bazlı sitoloji yöntemleri geliştirilmiştir (104,119). Genel olarak sıvı bazlı sitolojik taramanın geleneksel pap smear taramasına göre tanısal duyarlılığının daha yüksek olduğunu ve maliyetinin de daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (120). Smear taramalarının başarı oranlarının arttırılması için bilgisayar destekli sistemler geliştirilmiş ve HPV için de boyama yapan sistemler geliştirilmiştir. HPV tabanlı tarama diğer yöntemlere göre daha hassas, doğruluk oranı yüksek sonuç veren, daha az yanılma payı olan ve daha az tekrarlanabilir bir testtir. Avrupa kılavuzları HPV tabanlı taramayı önermektedir. Hollanda, Finlandiya, Türkiye, İtalya, İsveç ve Birleşik Krallık ulusal olarak HPV tabanlı taramayı kullanmaktadırlar (104).

Histolojik terminolojiyi tanıtmak ve tarama sonuçlarını değerlendirmek için Bethasta sistemi geliştirilmiştir ve son olarak 2014 yılında güncellenmiştir (121). Tarama testleri sonucu epitelyal hücre anomalileri (skuamöz hücre anomalileri (atipik skuamöz değişiklikler (ASC-US, ASC-H), düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL) ve yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) ve glandüler hücre anomalileri) olan hastalar klavuzlara göre takip edilir veya kolposkopik inceleme ile biyopsi alınarak histolojik tanıya gidilir (104,122). Servikal sitolojik anormalliklerin yönetimi ve histolojik olarak doğrulanmış servikal intraepitelyal displazi yönetimi güncellenmiş yönetim kılavuzlarına göre yapılmaktadır.

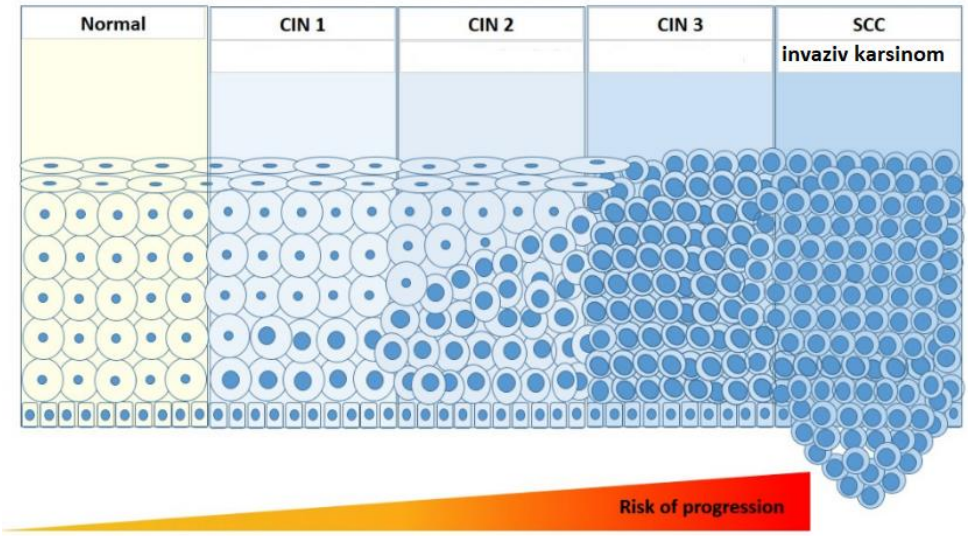
2.4.4.1. Ülkemizde Serviks Kanseri Tarama Stratejisi

Ülkemizde serviks kanseri taraması için hedef 30-65 yaş aralığıdır ve tarama 5 yılda bir HPV-DNA testi ile yapılmaktadır. HPV pozitif gelen hastalara sitolojik tarama eklenmiştir (HPV 16/18 pozitif olan hastalara direk kolposkopik inceleme önerilir). Sitoloji normalse 1 yıl sonra HPV test tekrarı yapılır. Sitoloji anormal olan hastalar kılavuzlara göre yönetilir. Taramalar Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezleri (KETEM) tarafından yürütülür (115).

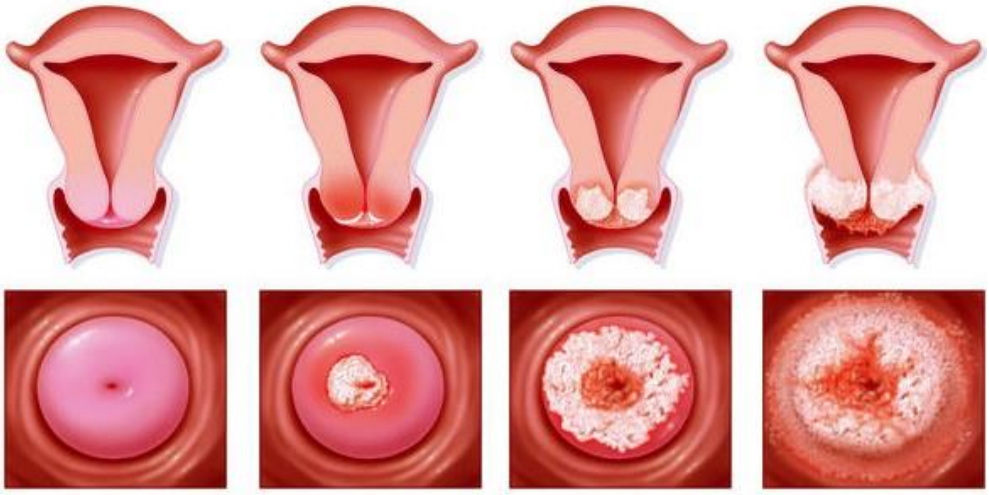
2.4.4.2. Servikal İntraepitelyal Neoplazi

Servikste epitel içinde sınırlı hücresel immatürite, dezorganizasyon, nükleer anormallikler ve artmış mitotik aktivite içeren neoplaziye dönüşebilen hücresel değişikliklere servikal intraepitelyal displazi (CIN) denir. CIN gelişimi için en önemli faktör persiste eden HPV enfeksiyonudur (95,123). Serviks kanserinin hafif servikal intraepitelyal displaziden (CIN 1) orta ve şiddetli displaziye (CIN 2-3) (Şekil 7), mikroinvaziv lezyonlara ve invaziv hastalığa kademeli olarak ilerleyen bir displazi öyküsü mevcuttur (Şekil 8). CIN 1'in %60'ının

gerilediği, %10'unun CIN 3'e ilerlediği, CIN 2'nin %40'ının gerilediği, %20'sinin CIN 3'e ilerlediği ve CIN 3 lezyonlarının ise %30'unın gerilediği ve %12'den fazlasının serviks kanserine ilerlediği bilinmektedir (124).



Şekil 7. Servikal Intraepitelyal Neoplazilerin Progresyonu (125)



Şekil 8. Serviks Kanserinin Progresyonu (126)

Servikal premalign lezyonlar kriyoterapi, termal ablasyon, soğuk konizasyon ve loop elektrocerrahi eksizyon (LEEP) ile basitçe tedavi edilebilmektedir (23).

2.4.5. Serviks Kanserinin Evrelenmesi

Prognozu değerlendirmek ve hasta için uygun tedavi yöntemini seçebilmek için jinekolojik kanserler için 2 evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bunlar; tümör, düğüm, metastaz (TNM) sistemi ve Uluslararası Kadın Hastalıkları ve Doğum Federasyonu (FIGO) sistemidir (127). FIGO evrelemesi bu zamana kadar esas olarak klinik muayeneye dayanıyordu. 2018'de bu, FIGO Jinekolojik Onkoloji Komitesi tarafından görüntüleme ve varsa patolojik bulguların evre atamasına izin verecek şekilde yeniden düzenlenmiştir (FIGO XXII Dünya Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi'nde sunulmuştur) (Tablo 4)

Tablo 4. Serviks Kanseri 2018 FIGO Evrelemesi (23)

EVRE I		Kanser kesinlikle serviks ile sınırlıdır (korpusa uzanım göz ardı edilmelidir)
IA		İnvazyon derinliği <5 mm, sadece mikroskopi ile teşhis edilebilen invaziv karsinom
	IA1	Stromal invazyon derinliği <3 mm
	IA2	Stromal invazyon ≥3 mm ve <5 mm derinlik
IB		Ölçülen en derin invazyon ≥5 mm olan invaziv karsinom (Evre IA'dan büyük), lezyon serviks uteri sınırlı
	IB1	İnvaziv karsinom ≥5 mm stromal invazyon derinliği ve en büyük boyutta <2 cm
	IB2	En büyük boyutunda ≥2 cm ve <4 cm invaziv karsinom
	IB3	En büyük boyutta invaziv karsinom ≥4 cm
EVRE II		Kanser uterus dışına yayılmıştır, ancak vajenin alt üçte birine veya pelvik duvara yayılmamıştır.
IIA		Parametriyal tutulum olmaksızın vajen üst üçte ikisi ile sınırlı tutulum
	IIA1	En büyük boyutta invaziv karsinom <4 cm
	IIA2	En büyük boyutta invaziv karsinom ≥4 cm
IIB		Parametrial tutulum var ama pelvik duvara kadar değil
EVRE III		Kanser vajen alt üçte birini tutar ve/veya pelvik duvara uzanır ve/veya hidronefroza veya böbrek fonksiyon bozukluğuna neden olur ve/veya pelvik ve/veya para-aortik lenf düğümlerini içerir.
IIIA		Kanser, vajenin alt üçte birini içerir ve pelvik duvara uzanmaz.
IIIB		Pelvik duvara uzanım ve/veya hidronefroz veya çalışmayan böbreğe (başka bir nedene bağlı olduğu bilinmiyorsa)
IIIC		Tümör boyutu ve yaygınlığından bağımsız olarak pelvik ve/veya para-aortik lenf nodlarının tutulumu
	IIIC1	Sadece pelvik lenf nodu metastazı
	IIIC2	Para-aortik lenf nodu metastazı
EVRE IV		Kanser, gerçek pelvisin ötesine geçmiştir veya mesane veya rektumun mukozasını tutmuştur (biyopsi ile kanıtlanmıştır).
IVA		Komşu pelvik organlara yayılma
IVB		Uzak organlara yayılma

NOT: Görüntüleme ve patoloji, mümkün olduğunda, tüm evrelerde tümör boyutu ve kapsamı ile ilgili klinik bulguları desteklemek için kullanılabilir. Patolojik bulgular görüntüleme ve klinik bulguların yerini alır.

2.4.6. Serviks Kanserinin Histopatolojisi

Tüm kanserlerde olduğu gibi serviks kanserinin tanısı da temel olarak histopatolojik olarak konulmaktadır. Servikal kanserlerin yaklaşık %80'ini skuamöz hücreli karsinom (SCC), %15'ini adenokarsinom, %3-5'ini ise adenoskuamöz karsinom oluşturmaktadır. Nöroendokrin veya küçük hücreli karsinomlar çok nadir olarak görümektedir ve prognozları daha kötüdür (Tablo 5)(128).

Tablo 5. WHO Kadın Genital Tümör Sınıflandırmasında Serviks Kanserinin Histolojik Tipleri (129)

Skuamöz Epitelyal Tümörler
Skuamöz hücreli karsinom, HPV ile ilişkili
Skuamöz hücreli karsinom, HPV'den bağımsız
Skuamöz hücreli karsinom NOS
Glandüler Tümörler
Adenokarsinom NOS
Adenokarsinom, HPV ile ilişkili
Adenokarsinom, HPV'den bağımsız, mide tipi
Adenokarsinom, HPV'den bağımsız, berrak hücre tipi
Adenokarsinom, HPV'den bağımsız, mezonefrik tip
Adenokarsinom, HPV'den bağımsız, NOS
Endometrioid adenokarsinom NOS
Karsinosarkom
Adenoskuamöz karsinom
Mukoepidermoid karsinom
Adenoid bazal karsinom
Karsinom, farklılaşmamış, NOS
Karışık Epitelyal ve Mezenkimal Tümörler
Adenosarkom
Germ Hücreli Tümörler
Endodermal sinüs tümörü
Yolk sak tümörü NOS
Koryokarsinom

2.4.7. Serviks Kanserinde Klinik ve Prognoz

Serviks kanseri erken evrelerde genellikle asemptomatiktir ve çoğunlukla tarama sonucu ile tespit edilir. Serviks kanserinin olası belirti ve semptomları; vajinal kanama (lekelenme, düzensiz kanama, postkoital kanama, abondan kanama), olağandışı vajinal akıntı (kanlı, pürülan, kokulu, kaşıntısız), pelvik ağrı (genellikle tek taraflı, kalça ve uyluğa yayılan), disparoni (cinsel ilişkide ağrı)'dir. İleri evre serviks kanserlerinde basıya ve metastazlara bağlı; ürinasyon ve defakasyon problemleri, kilo kaybı, güçsüzlük, kemik ağrıları gibi semptomlar görülebilir (130,131).

Serviks kanserinin en önemli prognostik faktörleri hastalığın evresi, tümörün boyutu, invazyon derinliği, ekstraservikal yayılım, uzak organ metastazı, lenfovasküler invazyon olması, lenf nodu tutulumu ve histopatolojik tümör tipidir (132,133). Yapılan bazı çalışmalarda serviks kanseri için revize edilmiş 2018 FIGO evreleme sisteminin 2009 FIGO evreleme sistemi ile karşılaştırılmış ve daha iyi 5 yıllık genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım, çoklu doğrulama denemeler ile gösterilmiştir (Tablo 6) (134,135).

Tablo 6. 2009 ve 2018 FIGO sınıflandırılmasının 5 yıllık sağkalım yüzdeleri (136)

EVRE	2009 FIGO 5 yıllık survival (%)	2018 FIGO 5 yıllık survival (%)
IA1	95.4	95.8
IA2	94.4	95.0
IB1	85.5	91.6
IB2	70.9	83.3
IB3	…	76.1
IIA1	68.0	70.3
IIA2	61.7	65.3
IIB	61.3	63.9
IIIA	40.5	40.7
IIIB	38.4	41.4
IIIC1	…	60.8
IIIC2	…	37.5
IVA	24.0	24.0
IVB	11.7	14.7

2.4.8. Serviks Kanserinin Tedavisi

Servikal kanserler fizik muayene, cerrahi ve görüntüleme sonuçlarına göre belirlenen evre ve biyopsi ile belirlenen histopatolojik tanıya göre temel olarak cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi tedavi seçeneklerinden biri veya birkaçının kombinasyonu ile tedavi edilir. Seçilecek tedavinin hasta için riskleri, komplikasyonları ve hastanın yaşı, ek hastalıkları, fertilite isteği göz önüne alınarak hastaya en uygun tedavi seçilmelidir (104,132).

Evre 1A invazyon derinliği < 5mm mikroinvaziv kanser olarak kabul edilir. Bu evrede hastaya tüm lezyonu içeren LEEP(Sıcak konizasyon), soğuk konizasyon, trakelektomi veya basit histerektomi ile tedavi edilebilir (137).

2.4.8.1. Erken Evre Serviks Kanseri Tedavisi

FIGO evre IA2, IB1 ve IB2 erken evre serviks kanserini ifade eder. Birincil tedavi genellikle cerrahi tedavidir. Serviks kanserinde uygulanan radikal histerektomi, 2017 Querleu-Morrow Sınıflandırması'na göre tiplendirilmiş (Tip A, B, C ve D), uygulanan tekniklerin tanımlanması ve evrensel olarak bir standartlaştırma hedeflenmiştir (138,139).

Cerrahi tedavi özellikle genç, ovaryan fonksiyonların ve fertilitesinin korunmasını isteyen hastalarda, lenf nodu tutulumunun tespiti, hastalık evresinin net olarak belirlenebilmesi açısından primer radyoterapiden daha avantajlıdır (140,141). Yaşlı, obez ve ek hastalıkları bulunan cerrahiyi tolere edemeyecek hastalarda tdavide primer olarak radyoterapi veya kemoradyoterapi tercih edilir (138).

Evre 1A1 hastalar konizasyon ya da basit histerektomi ile tedavi edilirler. Konizasyon sınırları pozitif ise doğurganlığın korunma isteğine bağlı olarak rekonizasyon, basit histerektomi veya modifiye radikal histerektomi (Tip B1) yapılır. Bu evrede lenf nodu metastazı yok denecek kadar az olduğundan lenfovasküler invazyon olmadıkça lenfadenektomi rutin olarak uygulanmaz (142). Evre 1A2 hastalar genellikle sinir koruyucu radikal histerektomi (Tip C1) veya standart modifiye radikal histerektomi (Tip B1 -Werthiem) ve pelvik lenfadenektomi veya sentinel lenf nodu (SLN) biyopsisi ile tedavi edilirler (143,144).

Evre IB1 ve IB2 serviks kanserleri tip C radikal histerektomi ve pelvik lenfadenektomi veya SLN biyopsisi ile tedavi edilirler (145,146). Fertilite isteği bulunan erken evre serviks kanserlerinde (özellikle tümör boyutu 2 cm den küçük, derin stromal infiltrasyonu ve lenfovasküler alan invazyonu (LVSI) olmayan) konizasyon ve trakelektomi, lenf nodu değerlendirmesi ile birlikte uygulanabilir (23,147).

Erken evre servikal kanserlerde evrelemede LN tutulumunun yeri olmasa da prognoz ve adjuvan tedavi gerekip gerekmediği konusunda önemlidir. >3mm invazyon derinliği olan, lenfovasküler invazyonu olan, yüksek riskli histopatolojik tanısı olan hastalara cerrahi LN değerlendirilmesinin yapılması önerilirir (148,149). Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) kılavuzlarında erken evre serviks kanserine SLN biyopsisinin dikkate alınması gerektiğini vurgular. SLN biyopsisi sayesinde hastaların morbidite oranları düşürülmüştür ve metastatik lenf nodu tutulumunun tespitinde fayda sağlamıştır (142). SLN biyopsisi ile hastalarda postop görülen lenfödem oranının da azaldığı görülmüştür (150).

Avrupa jinekolojik Onkoloji Derneği (ESGO)'nin kılavuzlarında erken evre servikal kanserlerde laparotomi veya minimal invaziv yaklaşımı radikal histerektomi için uygulanabilir olduğunu kabul etse de minimal invaziv yaklaşım hala tartışmalı bir konudur. Minimal invaziv yaklaşımın, laparotomiye kıyasla daha az intraoperatif kan kaybı, daha az postoperatif komplikasyon ve daha az hastanede yatış süresi gibi avantajları mevcuttur (151,152). Fakat sağ kalım ve nüks oranlarına bakıldığında, laparotomi ile benzer sonuçlar olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi sağkalımın daha düşük, nüksün daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Yapılan bu çalışmalara bakıldığında, 2 cm altında yüksek risk faktörleri olamayan erken evre serviks kanserli hastalarda minimal invaziv yaklaşım da tercih edilebilir (151,153–155).

Cerrahi tedavi sonrası patolojik sonuçlara ve hastalığın evresine göre (IA2-IIA) adjuvan tedavi uygulanabilir. Evre IA1 hastalara genellikle adjuvan tedavi uygulanmaz. Cerrahi sonrasında hastalar düşük, orta, yüksek riskli olarak gruplandırılırlar. Risk faktörlerini belirlemede özellikle Sedlis kriterlerine (en büyük tümör çapı >4 cm, LVSI ve servikal stromanın dış üçte birinin invazyonu) bakılır. Bu kriterlerin yanında pozitif lenf nodları, pozitif cerrahi sınırlar, pozitif parametrial tutulum ve tümörün histopatolojik tipi de önemlidir Yüksek-orta risk faktörleri olanlara (2 veya daha fazla risk faktörüne sahip) adjuvan tedavi (genellikle tek ajan kemoterapi ile beraber pelvik radyoterapi) uygulanır. Düşük riskli olanlara genellikle sadece pelvik radyoterapi önerilir. Verilen radyoterapi, genellikle brakiterapi ile beraber intensity modulated radiation therapy (IMRT) şeklinde tüm tümör yatağı ve bunların drene olduğu lenf bezlerini içine alacak şekilde veya EBRT olarak tüm pelvise uygulanır (142,156–158). Radikal cerrahi sonrası uygulanan adjuvan tedavinin hastalığın nüks etme olasılığını azalttığı görülmüştür (159).

2.4.8.2. Lokal İleri Evre Serviks Kanseri Tedavisi

Evre 1B3-IVA lokal ileri servis kanseri olarak tanımlanmaktadır. Primer olarak tek başına radyoterapi veya kemoradyoterapi tercih edilmektedir ve hastalık ne kadar erken evrede yakalanır ve tedaviye başlanırsa tedavi başarısı da o kadar yüksek olmaktadır (142). Eş zamanlı sisplatin bazlı kemoterapi+ radyoterapi (CCRT)+ adjuvan intrauterin brakiterapi ile kombine edilmiş EBRT lokal ileri serviks kanseri için standart tedavidir (160,161). Lokal ileri evre serviks kanseri için radyoterapi ve kemoradyoterapi tedavi sonuçları birçok çalışmada karşılaştırılmıştır ve kemoradyasyon tedavisi alanlarda sağ kalım oranlarının daha yüksek, lokal veya uzak nüks oranının daha düşük olduğu görülmüştür (28,162,163). Kemoterapide genellikle tek ajan tercih edilir, kombine tedavi birincil tedavide önerilmemektedir (164,165).

Bazı seçilmiş hastalara (servikal lezyonu çok büyük, uterin segment tutulumu olan, vb.) kemoradyasyonu takiben basit histerektomi uygulayan merkezler vardır fakat sağ kalımı iyileştirdiğine dair yeterli kanıt bulunmadığından genellikle tercih edilmez (166). Radyoterapiye erişimin kısıtlı olduğu bazı yerlerde lokal ileri evre serviks kanserinin tedavisinde neoadjuvan kemoterapi+cerrahi tedavi olarak tercih edilebilir (23,145).

2.4.8.3. Metastatik Hastalığın Tedavisi

Servikal kanserli hastaların ilk başvuruda sadece %2 sinde uzak metastatik hastalık tespit edilmiştir ve bu hastaların ortalama sağ kalımı 7 aydır (23). Metastatik serviks kanserinin yönetimi tanı anındaki mevcut evre ve metastaz yapılan bölgelere göre karar verilirek yapılır. Servikal kanserler metastazları lenfatik, hematojen veya direkt yayılım ile yaparlar. En sık metastaz lenf nodlarında görülür. Lenf nodu yayılımı ile genellikle obturator, eksternal iliak, internal iliak ve oradan da iliak komunis ve para-aortik lenf nodlarına yayılır. Direkt yayılım ile uterus korpusu, vajen, parametrium, periton boşluğu, mesane veya rektuma metastaz yapabilir. Servikal kanserler hematojen olarak ise en sık akciğer ve karaciğere yayılır (23,167). Kemik, adrenal bezler, barsaklar ve omentum diğer sık tutulan yerlerdir. Servikal kanserlerin metastazlarının bölgesel tutulum prevalansları; pelvik LN (%75) veya para-aortik LN (%62), akciğer (%33-38), karaciğer (%33), periton (%5 -27), adrenal bez (%14-16), bağırsaklar (%12) ve cilt (%10) şeklindedir (168).

Bazı sınırlı metastatik vakalarda nüks alanındaki nodülün cerrahi olarak çıkarılmasını içerir. Fakat daha yaygın metastazları bulunan hastalar için sistemik kemoterapi ve radyoterapi uygulanır (145,169). Kemik metastazı olan hastalara, kemoradyoterapinin yanında bifosfonat, beyin metastazı olan hastalara palyatif radyasyon uygulanabilir (169).

Kemoterapinin amacı en az toksisiteyle en iyi sağ kalım süresi ve yaşam kalitesini elde etmektir. Sisplatin ve karboplatin serviks kanseri tedavisinde en sık kullanılan iki kemoterapötik ajandır (170,171). Sisplatin alkilleyici bir antineoplastik, küçük moleküllü bir platin bileşiğidir. Güçlü antikanser aktivitesine rağmen ilacın sitotoksik özelliklerine bağlı yan etkilerin ortaya çıkması ve çoklu moleküler faktörlere bağlı ilaca karşı gelişen direnç tedaviyi sınırlandıran faktörlerdir. Sisplatinin en sık görülen yan etkileri bulantı, kusma, nefrotoksisite, nörotoksisite (nöropati), ototoksiste (işitme kaybı) ve hematoksisitedir (27,28). Sisplatin ile sık olarak kombine edilen kemoterapi ajanları: paklitaksel, karboplatin, gemstabin, vinorelbin, topotekandır (172). Metastatik serviks kanserinde kemoterapide genellikle platin bazlı bir kombinasyon önerilir. Kombinasyon tedavilerinin tek ajan sisplatin tedavisine göre toksisitesinin daha yüksek olduğu düşünülse de tedavi etkinliği tek ajana göre daha başarılıdır.

Toksisitenin daha fazla olmasına rağmen hastaların yaşam kalitesinde belirgin bir azalma olmamışıtr (173,174).

Metastatik hastalığı olan ve lokal tedavi yaklaşımı için uygun olmayan ilerlemiş ve nüks eden serviks kanseri hastalarına birinci basamak tedavi olarak platin bazlı bir kemoterapi kombinasyonu+anjiyogenez inhibitörü bevacizumab tedavisi FDA tarafından onay almıştır ve kemoterapiye bağlı nörotoksistenin bevacizumab ile azaltıldığı, hastaların yaşam kalitelerinin daha kötü olmadığı görülmüştür (175,176). Standart kemoterapi tedavileri bazı hastalar için yetersiz kalmaktadır. İmmünoterapiyi hedefleyen pembrolizumab bu hastalar için alternatif tedaviler sağlamaktadır. Pembrolizumab (PD-1 inhibitörü) kanser tedavisi için birçok kez denenmiştir ve nihayetinde FDA, tekrarlayan veya metastatik servikal kanserlerin tedavisi için kullanımını onaylamıştır. Fakat tek başına kullanımından ziyade standart tedavilere eklenilmesi tedavi etkinliği açısından uygundur (177).

2.4.8.4. Nüks Serviks Kanserinin Tedavisi

Servikal kanser nüksü birincil tedaviden yaklaşık 7-36 ay süre içerisinde görülmektedir. Bu yüzden tedavisi tamamlanan hastalar ilk 5 yıl yakın takip edilir; İlk 2-3 yıl 3-4 ayda bir, daha sonra 5 yıla kadar 6 ayda bir takip edilir. 5 yıl nüksüz dönemden sonra hastalar yıllık takibe alınır (178). Tedavisi tamamlanan servikal kanserli hastaların takibi, tedaviye bağlı komplikasyonların ve nükslerin erken tespiti için çok önemlidir. Takipte hasta öyküsü, vajinal kaf muayenesi ve bimanuel pelvik muayene özellikle asemptomatik hastaların tespiti için önemli bir yere sahiptir. Asemptomatik hastalara rutin olarak görüntüleme istenmesi ise tartışmalıdır (179,180).

Serviks kanseri nüksü genellikle semptomatik hastalarda teşhis edilir ve bu hastalarda en sık görülen semptom ağrıdır (181). Tekrarlayan serviks kanserlerinin tanısında lokal nüks, metastatik hastalık ve lenf nodu tutulumun değerlendirilmesinde en yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip görüntüleme yöntemi PET/CT'dir (182). PET/CT serviks kanserinin ilk incelemesinde, evrelemesinde ve tedavi sonrası takipte sıkça tercih edilir. 2015 NCCN kılavuzlarına göre nüks açısından yüksek risk taşıyan hastalara asemptomatik dahi olsalar tedaviden 3-6 ay sonra PET/CT çektirilmesi önerilir (183).

Serviks kanseri tedavi sonrası nüksler genellikle lokal, bölgesel veya uzak metastaz olarak görülmektedir. Yapılan bazı çalışmalar sonucunda serviks kanserinin nükslerinin %22-56 ile lokal (serviks, parametrium, uterus ve vajen), %28-37 pelvik yan duvarlara ve %15-61 uzak metastaz veya çoklu nüks ile karşımıza çıktığı görülmüştür (167,179). Erken evre radikal

histerektomi ile tedavi edilmiş hastalarda nüks riski %15-30 aralığındadır ve genellikle vajinal semptomların ön planda olduğu lokal pelvik nüksler görülür. Lokal nüksler tek başına radyasyon veya kemoradyasyon ile tedavi edilebilirler (184,185).

Nüks servikal kanserlerde lenf nodları tutulumu öncelikle bölgesel lenf nodlarında görülürür. İkincil olarak sakral ve paraaortik lenf nodları gibi uzak lenf nodları tutulur ki bunların prognozu daha kötüdür (168). Serviks kanserli hastalarda ilk tanı aldıklarında lenf nodu tutulumu mevcutsa ileri evre hastalık olma ve bu hastaların nükslerinin metastatik olma ihtimallerinin daha fazla olduğu görülmüştür (181,186). Yapılan bir çalışmada nöroendokrin tümörler, 2-4 cm tümörler, 3 ve 3 ten fazla lenf nodu tutulumu ve lenfovasküler alan invazyonu olanlarda nüks oranlarının yüksek olduğu görülmüştür (179).

Lokal invaziv nüks servikal kanserlerde hasta daha önce radyoterapi almışsa bu hastalar için en iyi tedavi seçeneği pelvik ekzenterasyon olmaktadır. Kemoterapi ise tek başına bu hastalarda yetersizdir (187). Pelvik yapıların genişletilmiş multi-organ rezeksiyonu olan pelvik ekzenterasyon temel olarak uterus, overler, vajen, mesane, rektum ve üretranın rezeksiyonunu kapsar (188). Pelvik ekzenterasyon 5-14 saat operasyon süresine sahip, multidisipliner yaklaşım ve birden fazla farklı klinik cerrahlarına gereksinim duyan büyük bir cerrahi işlemdir ve önemli mortalite ve morbidite oranları mevcuttur. Pelvik ekzenterasyon öncesi hastalığın metastatik olmadığı netleştirilmeli ve hastanın bu büyük cerrahi işlemi tolerasyonu iyi değerlendirilmelidir (188,189). İlk zamanlarda pelvik ekzenterasyon için mortalite oranı %23 iken günümüzde bu operasyon için iyi eğitimli, tecrübeli cerrahların bulunduğu, başta kan merkezi olmak üzere tüm imkanlara sahip uzmanlaşmış merkezlerde bu oran %1-2 lere düşürülmüştür (188). Morbidite oranları ise %20-80 arasında değişmektedir ve en önemlisi septik komplikasonlardır (189). Pelvik ekzenterasyon sonrasında hastanın yaşam kalitesini arttırmak, vajinal obliterasyonu engellemek kadının cinsel aktivitesini korumak için kısmi veya tam rekonstrüksiyonu ve postoperatif komplikasyonları (özellikle gastrointestinal fistülleri ve enfeksiyonu) azaltmak ve pelvik tabanı desteklemek için flep kullanımı uygulanabilir (190,191). Pelvik ekzenterasyonda minimal invaziv teknikler daha az kan kabı ve daha kısa hastanede kalış süresi gibi faktörler nedeni ile önem kazanmaktadır fakat sağkalım üzerine etkilerini kıyaslayan yeterli çalışma yoktur. Minimal invaziv cerrahi büyük tümörler ve uygun olmayan anotomide uygulanması önerilmemektedir (192–194).

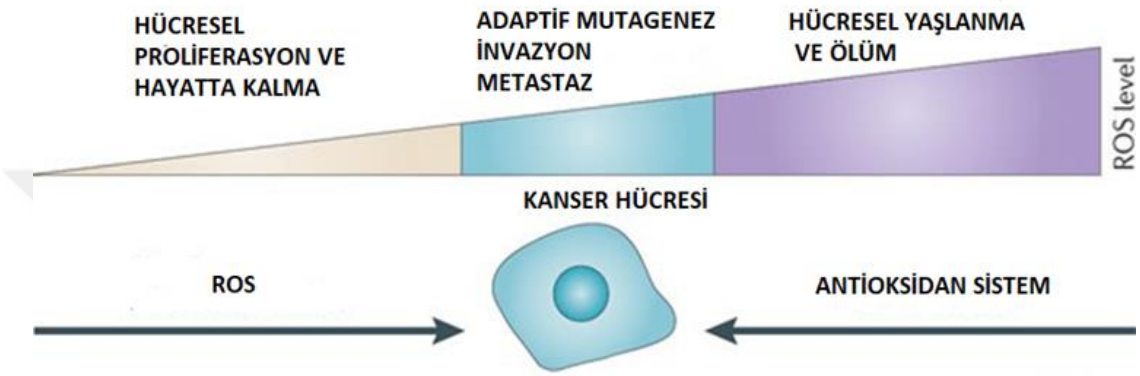
2.5. Kanser ve Oksidatif Stres

Hemen hemen tüm kanser türlerinde tümör gelişimi ve ilerlemesini tetikleyen endojen ve eksojen (alkol, sigara, ağır metaller, endüstriyel çözücüler, pestisitler, halotan, radyasyon, vb.) kaynaklı yüksek oranda reaktif oksijen türleri (ROS) tespit edilmiştir (3,4). Farklı biyolojik görevleri olan süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$), ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen türleri (ROS), moleküler oksijenin kısmi indirgenmesi ile oluşan, eşleşmemiş elektronlar içeren kısa ömürlü aşırı reaktif moleküllerdir (12). Bu moleküller oksidatif strese neden olabilen aerobik metobolizmanın ürünleri olduğundan dolayı mitokondri ROS'un ana kaynağı olarak kabul edilse de endoplazmik retikulum ve peroksizomlarda da çeşitli metabolizmalarla ROS üretilmektedir (195–197). ROS'lar hücresel metabolizma, çoğalma, farklılaşma, sinyal iletimi, bağışıklık sistemi ve anjiogenez gibi birçok hücresel olaylarda görev almaktada, ayrıca çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitter tarafından hücre içi sinyal iletiminde ikincil haberciler olarak kullanılmaktadırlar (5–7).

ROS'lar, son yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip son derece kararsız ve reaktif moleküllerdir. Kararlı duruma geçmek için DNA, protein, lipid gibi biyomoleküller ile reaksiyona girebilirler. Bahsedildiği üzere birçok hücresel fonksiyon için elzem olan ama bir taraftanda artan miktarı hücresel fonksiyonları bozan ROS'ların hücre içi seviyeleri normal fizyolojik koşullar altında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler tarafından elimine edilerek sürekli olarak korunur (8,9). Hücrelerde oksidan ve antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidan sistem lehine bozulmasıyla ROS birikimi olur ve oksidatif stres meydana gelir (10). Sonuç olarak, kronik inflamasyon, metabolik hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalık ortaya çıkar (198–201).

Artan ROS seviyelerine bağlı oluşan oksidatif stres onkojeniktir, DNA, protein ve lipitlere zarar vererek çeşitli mutasyonlara ve kanser oluşumuna neden olur. Bu kanser hücrelerinin çok fazla ATP ve besin harcayarak sürekli çoğalmasına neden olur. Kanser hücrelerinin sahip olduğu bu hipermetabolizma mitokondri, endoplazmikretikulum ve NADPH oksidazlardan çok miktarda ROS üretimine neden olur (3,4,196). Hücrelerde artan ROS seviyeleri ve oksidatif stres onkojenik mutasyonların oluşumu ve nihayetinde kanser hücrelerinde; tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı, glikoz metobolizmasında artış ve hipoksiye adaptasyon gibi kanser mekanizmalarının geliştirilmesinde rol alır (5,12,202). Artan ROS düzeyleri kanser hücrelerinde hücresel sinyalleşme mekanizmaları sayesinde

proliferasyonda, büyümede ve hücrelerin hayatta kalmasında (apoptozdan kaçış) rol oynar. ROS'un kanser hücrelerinde çeşitli yolaklarda rol alarak metastaz ve anjiyogeneze de katkıda bulunduğu bilinmektedir (Şekil 9) (12,203–205). Kanser hücrelerindeki toksik düzeye gelen ROS seviyeleri hücre döngüsünün durmasına ve apoptozun indüklenmesine ve hücre ölümüne neden olarak anti-tümorejenik etki gösterebilir (12). Kanser hücreleri ROS un hücre ölümünü indükleyebilecek toksik düzeylere gelmesini engellemek için yüksek düzeyde antioksidan aktivite sağlar (10).



Şekil 9. Kanser ve ROS seviyeleri arasındaki ilişki (196).

2.5.1. Antioksidan Sistem

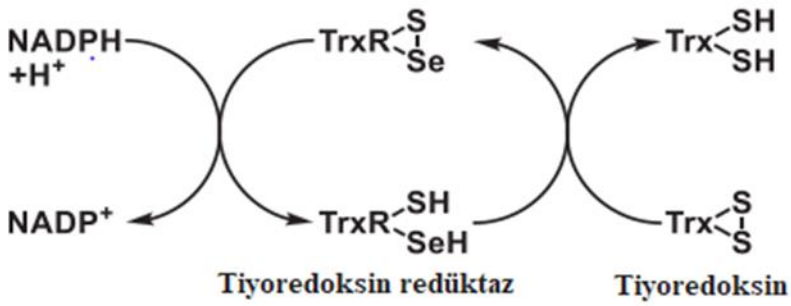
Reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getiren ve hücreleri bu radikallerin zararlı etkilerinden koruyan hücrelerin ölümüne engel olan biyolojik sistemlere antioksidan sistemler denir (196,206,207). Enzimatik antioksidanlardan süperoksit dismutaz, süperoksit redüktaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, peroksiredoksin ve tioredoksin sistem en önemlileridir. Enzimatik olmayan antioksidanlara ise glutatyon, flavonoidler, A vitamini, C vitamini ve E vitamini örnek gösterilebilir (12).

Artan ROS seviyelerine karşı ilk olarak gelişen hücresel adaptasyon mekanizması glutatyon sistemi ve tiyoredoksin sistemi gibi hücresel redoks dengesini sağlayan temel sistemlerin devreye girmesidir (206,207).

2.5.1.1. Tiyoredoksin Sistem

Tiyoredoksin sisteminin temel bileşenleri: tiyoredoksin (Trx), tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfattır (NADPH) (15). Tiyoredoksin sistemi rekatif oksijen ve nitrojen türlerini, tiyol bağımlı peroksidazlar gibi diğer antioksidan sistemlere elektron sağlamak için aktivite göstererek uzaklaştırır (208).

Tiyoredoksin sistem başlıca hücresel redoks dengesinin düzenlenmesi, oksidatif strese karşı savunma ve hücre içi sinyalleşmede görev alır. Bunun dışında; DNA sentezinde, hücre içi proteinlerin indirgenmiş halde tutulmasında, farklı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu veya inhibisyonunda, apoptozun düzenlemesinde, hücre dışında hem bir sitokin hem de kemokin gibi görev yaparak immunmodulasyonda, gebelikte sitotrofoblastlarda sentezlenerek implantasyonda, glial hücrelerden salgılanarak nöronal sağkalımı destekleyerek merkezi sinir sisteminde ve benzeri birçok yerde görev alır (14,15).

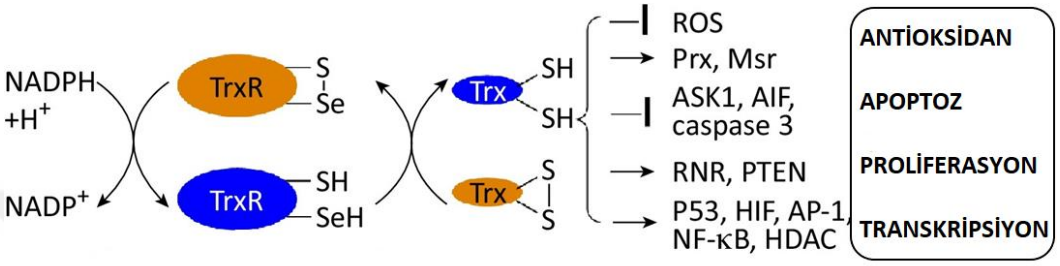


Şekil 10. Tiyoredoksin Sisteminin Reaksiyon Mekanizması (209).

Tiyoredoksin (Trx): İlk olarak 1964 yılında *Escherchia coli*'de tanımlanan küçük (~12 kDa) redoks proteinleridir ve korunmuş bir redoks katalitik bölgesi (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys) tüm organizmalarda tanımlanmıştır. Trx disülfid/ditiyol değişimini katalize eder. Tiyoredoksin disülfid (Trx-S_2), tiyoredoksin redüktaz (TrxR) katalizörlüğünde NADPH dan 2 elektron alarak tiyoredoksinin aktif formu ditiyole (Trx-SH_2) indirgenir ve bu redoks hemostazının temelini oluşturur (Şekil 10). Memeli hücrelerinde sitozolik Trx1, mitokondriyal Trx2 ve spermatozoada yüksek oranda eksprese edilen bir Trx varyantı SpTrx olmak üzere 3 Trx izoformu tanımlanmıştır (210–213).

Trx1'de aktivitenin redoks düzenlenmesinde ve NO sinyalleşmesinde rol oynayan üç ilave sistein bulunmaktadır. Trx1'in temel görevi sinyal iletiminde redoks düzenleyici olarak görev yapmaktır. Trx1 hücre döngüsü kontrolü, hücre proliferasyonu, transkripsiyonda rol aldığı ve sinyal peptidi olmamasına rağmen hücresel sinyal iletimininde de görev aldığı bilinmektedir. Yüksek Trx1 ekspresyonu antioksidan özellik gösterir ve yüksek ROS seviyelerinin oksidatif strese ve ciddi hücresel hasara neden olarak hücre ölümüne neden olmasını yani anti-tümorojenik etiksini engeller. Trx1'in, VEGF üretimini arttırarak tümör anjiyogenezisini desteklediği de bilinmektedir (214). Yapılan çalışmalarda Trx1'in apoptoz sinyal düzenleyici kinaz (ASK1) aktivitesini ve ASK1'e bağlı apoptozu inhibe ettiği (215), kaspaz-3 aktif bölge sisteininin S-nitrozasyonunu katalize ederek apoptozu doğrudan inhibe

ettiği (216) ve Trx-AIF (Apoptoz indükleyici faktör) kompleksinin DNA hasarını baskılayarak apoptozu engellediği görülmüştür (217). Trx1 kanser hücrelerinin ana tümör baskılayıcı geni PTEN'e redoks bağımlı bir şekilde bağlandığı gösterilmiş ve artan Trx1 seviyelerinin PTEN'in tümör baskılayıcı aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (218). Tiyoredoksin sistem NF-κB, p53 ve Ref-1 gibi hücre büyümesi, hayatta kalması ve anjiyogenez ilişkili transkripsiyon faktörleri aracılığı ile gen regülasyonuna katıldığı da bilinmektedir (Şekil 11) (219).



Şekil 11. Tiyoredoksin Sisteminin Katalitik Döngüleri ve İşlevleri (15).

Tiyoredoksin redüktaz (TrxR) enzimleri bir FAD prostetik grubu, bir NADPH bağlanma bölgesi ve bir ditiyol/disülfid motifi içeren homodimerik proteinlerdir ve bir redoks aktif bölgesi olan piridin nükleotid disülfid oksidoredüktazların flavoprotein ailesine aittir. TrxR redoks proteini tioredoksininin ve ayrıca diğer endojen ve eksojen bileşiklerin NADPH'ye bağlı indirgenmesini katalize eder. Memeli tiyoredoksin redüktazlar prokaryot ve diğer ökaryot canlılardakinden daha büyük alt birim başına 55-65 kDa büyüklüğünde proteinlerdir. Memelilerde sitozolik TrxR1, mitokondriyal TrxR2 ve TrxR3 (tiyoredoksin/glutatyon redüktaz (TGR)) olmak üzere 3 TrxR izoformu tanımlanmıştır. TrxR'lerin C terminallerinde selonosistein (sec) kalıntısı mevcuttur, bitişik sistein ile birlikte bir selenotiyol/selenosülfit değişimi başka bir redoks aktif bölgesi oluşturur ve bu sec içeren aktif bölgesi sayesinde geniş substrat spesifikliği gösterir. Tüm memeli TrxR izoenzimlerinin selenyum içerdiği ispatlanmıştır ve memeli TrxR'nin sadece oksitlenmiş Trx içindeki disülfidi değil diğer bazı proteinlerdeki disülfidleri de indirgediği görülmüştür (15,212).

Hücrelerde ROS artışı ile sisteinin oksidasyonu proteinlerin normal işlevlerini bozduğu için hücresel metabolizmada istenmeyen bir durumdur. ROS aracılı hücresel hasar ve hücre ölümünün engellenmesi için vücutta bazı indirgeyici antioksidan sistemler mevcuttur. TrxR proteinlerdeki oksitlenmiş sisteini tiyollere indirgeyerek proteinlerin normal fonksiyonlarının yeniden kazanılmasını sağlayan antioksidan bir enzimdir (213).

2.5.1.2. Kanser Tedavisinde Tiyoredoksin Sistemin Hedeflenmesi

Hücrelerdeki redoks sisteminin kanser hücrelerinin proliferasyon, büyüme, çoğalma, apoptazdan kaçış, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, anjiyogenez ve metastaz gibi her aşamasında rolü olduğu görülmüştür (11,12). Tiyoredoksin sistem hücresel redoks hemostazının sağlanmasında en önemli sistemlerden biridir ve çift yönlü işleve sahiptir. Başlangıçta antioksidan mekanizmaların devreye girmesiyle ve diğer antioksidan sitemlere elektron sağlayarak hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasını ve normal hücrelerin malign gidişatını engellemeye çalışırken, onkojenik dönüşüm başladıktan sonra yüksek TrxR/Trx seviyelerinin tümöral hücrelerde proliferasyon, çoğalma, apoptaza direnç, anjiyogenez ve metastazı kolaylaştırdığı görülmüştür (15,220,221).

Kanser hücrelerinde görülen artmış tiyoredoksin sistem aktivitesi, oksidatif stres ve ROS aracılı kanser hücrelerinin apoptoza gitmesine karşı korumada yani anitikanser tedaviye dirençte önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle TrxR inhibisyonunu hedef alan antikanser ilaçlar geliştirilmesi önem kazanmıştır. TrxR veya Trx inhibitörleri oksidatif strese yol açan, apoptozu indükleyen ve transkripsiyon, proliferasyon ve anjiyogenezi aşağı doğru düzenleyen aşağı akış yollarını etkilemekte ve kanser tedavisinde kullanılabilmektedirler (15,213).

Meme, serviks, akciğer, karaciğer ve mide kanseri gibi birçok kanserde hem Trx hem de TrxR'nin aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir ve tümör agresifliği arttıkça daha fazla eskprese edildiği görülmüştür (16–19). Bir *in vivo* çalışmada, primer mide karsinomlarında Trx1 aşırı ekspresyonu ile kanser hücresi proliferasyonu ve azalmış apoptoz arasında pozitif bir ilişki gözlenmiştir (222).Yapılan bir çalışmada 13 servikal skuamöz kanserli doku ve komşu kanserli olmayan dokularda western blot ve immünohistokimyasal çalışmalarla Trx1 eskpresyonu analiz edilmiştir. Servikal skuamöz hücreli kanserlerde artan Trx1 seviyeleri gösterilmiş, kemoterapiye dirençli servikal kanserlerde Trx1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiş ve Trx1'in kemorezistansla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır (29).

TrxR enzim inhibitörleri: TrxR enzim inhibitörleri genellikle TrxR aktivitesi için gerekli olan hem de tiyoredoksin C-terminal ucunda yüksek oranda bulunan sec redoks kalıntısını hedefler (213,223).

TrxR/Trx inhibitörleri doğal ve sentetik moleküller olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Kurkumin, shikonin, gambogik asit, sekurinin, arsenik, alantolakton ve mitomisin c doğal moleküllere örnek gösterilebilir. Ebselen ve selenit gibi selenyum içeren bileşikler, PX-12,

dimesna, sisplatin gibi platin içeren bileşikler, auronofin gibi altın içeren bileşikler ve diğer metal içeren inhibitörler ise sentetik olanlara örnek gösterilebilir (15,20).

Longa bitkisinden elde edilen doğal bir molekül olan kurkuminin HeLa hücre kültüründe TrxR1 aktivitesini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek antikanser özellikleri olduğu gösterilmiştir (224). Başka bir çalışmada sentetik kurkumin analoğu B5'in insan servikal hücre hattı CaSki ve SiHa'da TrxR'ı inhibe ederek antikanser aktivite sergilediği gösterilmiştir (225). Bitki kaynaklı doğal bir madde olan alantolaktonun Hela hücre kültüründe TrxR'ı inhibe ederek oksidatif stres aracılı apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (226).

Glutatyon peroksidaz benzeri aktiviteye sahip bir selono-organik bileşik olan ebselen TrxR için iyi bir substrattır ve Trx tarafından inidirgenme için disülfid substratları ile rekabet etmektedir. Sonuç olarak ebselen tiyoredoksin sisteminin protein disülfid indirgenmesinin bir inhibitörüdür. Ebselenin *in vivo* yapılan çalışmalar sonucunda Trx aktivitesinin inhibisyonu ve ROS artışı ile sonuçlanarak apoptozu indüklediği ve antikanser etkileri olduğu gösterilmiştir (227,228). Aynı şekilde ebselen anaolğu butaselen'in hepatosellüler karsinomda TrxR aktivitesini inhibe ederek kronik inflamasyonu, sirozu ve tümör ilerlemesini engelleyerek hepatokarsinogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (229).

Çeşitli bitkilerin aktif bileşeni olan seskiterpen laktonlar (SL) son zamanlarda antikanser özellikleri olduğu bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda SL'lerin akciğer, meme, kolorektal kanser, melanom ve lösemi gibi çeşitli tümör hücrelerinde proliferasyonu ve migrasyonu inhibe ettiği, apoptozu indüklediği bildirilmiştir (230–234). Yapılan bir çalışmada *Elephantopus* mollis'ten izole edilen doğal bir SL ailesi üyesi olan EM23'ün insan servikal kanser hücre dizilerinde (CaSki ve SiHa) TrxR hedefli antikanser özellikleri göterilmiştir. EM23'ün sec kalıntısına bağlanarak TrxR aktivitesini azalttığı, Trx/TrxR eskpresyonunu inhibe ettiği ve ROS birikimine bağlı olarak apoptozu ve otofajiyi indüklediği görülmüştür. Özetle yapılan bu çalışma EM23'ün servikal hücre hattında *in vitro* olarak etkili bir antikanser ajan olabileceğini göstermiştir (235).

Bir antikanser ilaç olan mitomisin C'nin DNA alkilizasyon mekanizmasının yanında *in vitro* ve *in vivo* olarak TrxR'yi de inhibe ettiği ve bu inhibisyonun ilacın sitotoksisitesi ile ilgili olabileceği gösterilmiştir (21). Diğer bir antikanser ilaç olan gemsitabinin konjuge edilmesiyle hücrelerde TrxR tarafından spesifik gemstabin salınımı sağlayan bir ön ilaç olan S-Gem üretilmiştir. Bu ön ilacın gemstabine göre daha az sitotoksik olduğu gösterilmiştir ve kanser tedavisinde yeni bir strateji sağlayacağı öngörülmektedir (22).

Platin bazlı ajanlar serviks kanserinde olduğu gibi baş ve boyun, testis, over, akciğer ve kolorektal kanserlerin tedavisinde de sık olarak tercih edilmektedir. Platin bazlı ajanların sitotoksik mekanizmalarının ilk hedefi DNA'dır. Bu ajanlar DNA'ya çapraz bağlarla bağlanarak transkripsiyonu baskılar, hücre döngüsünü etkiler ve apoptozisi indüklerler. Yapılan bir çalışmada platin bazlı alkilleyici ajanların TrxR'yi de etkili bir şekilde inhibe ettiği ve TrxR inhibisyonunun artan ROS'a bağlı daha fazla DNA hasarı ve ardından hücre ölümüne götüren sitotoksik etkilerini açıklayan önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (24–26). Hastalar başlangıçta platin bazlı ilaçlara iyi yanıt verse de daha sonra sitotoksik etkiyi önlemek için hücreler, yüksek ROS seviyelerine adaptasyon ve ilaca karşı direnç geliştirirler. Direnç gelişimi ile klinik etkinlikleri belirgin şekilde azalır (236–238).

Literatüre bakıldığında TrxR/Trx sistem hedefli antikanser ajan geliştirmede doğal bileşiklerin eşsiz bir kaynak olduğu söylenebilir. Bu sebeple kanser hücrelerinde bu sisteme spesifik etki edecek yeni doğal ürünlerin karakterize edilmesi önemlidir.

2.6. Kanser Tedavisinde Doğal Ürünler

Kemoterapötiklerin bir kısmı, monoklonal antikorlar, immunoterapiler ve nükleik asit bazlı tedavilerin tamamı doğal kökenlidir (239,240). Kanser kemoterapötiklerinin yaklaşık %74'ünü doğal ürünler (mikrobiyal, bitki veya deniz kaynaklı ürünler) ya da doğal ürünlerden üretilen sekonder metabolitlerin oluşturduğu bilinmektedir (241). Vinkristin, vinblastin gibi vinca alkaloidleri, taksanlardan paklitaksel ve docetaxel, etoposid ve teniposid, topotekan ve irinotekan doğal kaynaklı ilaçlara örnek verilebilir (239). Son 50 yılda doğal ürünlerden ilaç keşfinde başarılı adımlar atılmıştır ve yeni ilaç arayışları hala devam etmektedir. Doğal ürünlerin kaynak olarak kullanıldığı ilaç keşfine olan ilgi 29 Aralık 1993 yılında Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi'nin kabul edilmesiyle artmıştır. Appendino ve Pollastro'nun bir incelemesi sonucu yeni ilaçlar keşfetmek için kesinlikle doğal ürün kaynağı olarak bitki biyoçeşitliliğinden faydalanmak gerektiği vurgulanmışıtır (242).

Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi kanser tedavisinde temel tedavi yöntemleridir. Hormon tedavisi, gen tedavisi, biyolojik ajanlarla tedavi ve immunoterapi gibi diğer tedavi yöntemleri de mevcuttur. Bu tedaviler, kanserin histopatolojik türü, evresi ve yerleşim yerine göre değişik kombinasyonlarla kullanılabilmektedir. Tedavide temel amaç kanserli hücreleri normal hücrelere zarar vermeden öldürmektir. Fakat birçok kanser tedavisi kanserli hücrelerle beraber normal hücrelere de zarar vermektedir ve çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle daha az yan etkiye sahip kanser hücrelerine spesifik olarak etki edecek tedavilere ihtiyaç vardır (30,240). Bitki ve hayvanların da dahil olduğu canlı mikroorganizmalardan elde

edilen doğal ürünlerin kemoterapi ilaçlarına iyi bir alternatif olduğu ve bu ilaçlarla kombine kullanıma uygun olduğu düşünülmektedir. Diğer ilaçlara göre kanser hücrelerine daha spesifik etki gösterirler ve böylelikle yan etkiler daha az görülür (243). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı gelişen direnç, kanser tedavisinin en önemli zorluklarındandır. Direnç mekanizmaları çok faktörlüdür ve çoklu moleküler yolakları içerir. İlaç direncine karşı yeni ilaçlar ve stratejiler geliştirilmesi kanser tedavisinde önemli bir yere sahiptir ve doğal ürünler bunun için en önemli adaylardır (31–33).

2.6.1. Liken Asitleri

Likenler, yapıları birbirinden tamamen farklı bir mikrobiyont (mantar) ve bir fotobiyontun (alg veya siyanobakter, fotosentetik ortak) simbiyotik birlikteliğine sahip, biyoaktif sekonder metabolit kaynağı oluşturan, ekolojik olarak zorunlu ve karmaşık yapılı mikroorganizmalardır. Mikrobiyant liken birlikteliğinin ihtiyacı olan su, karbondioksit ve minerallerin sağlanmasında, fotobiyont ise sahip olduğu klorofil ile fotosentez yaparak organik maddelerin ve oksijenin sağlanmasında görev alır (34,35). Likenler turuncu, sarı, kırmızı, yeşil, gri, kahverengi ve siyah renkler dizisi sergiler ve tropiklerden kutup bölgelerine kadar tüm karasal iklimlerde bulunurlar. Kayalar, toprak, bitki yaprakları, çöller gibi hemen hemen her ortamda bulunabilirler. Doğada çok yavaş büyümektedirler ve büyük bir çoğunluğu uzun ömürlüdür. Şimdiye kadar 1000'den fazla liken sekonder metaboliti rapor edilmiştir (35,244). Likenler ve metabolitleri çeşitli biyolojik ve kimyasal özelliklere sahiptir. Eski zamanlarda alopesi, artrit, öksürük, bazı akciğer hastalıkları, hiperbillirubinemi, oral aft, bazı cilt hastalıkları ve epilepsi gibi birçok hastalıkta geleneksel tıbbi tedavilerde kullanılmış (34) ve kozmetik sektörde renkli boyaların üretimi, tıp, eczacılık ve gıda dahil tüm endüstrilerde kullanılabilir olduğu gösterilmiştir (245).

Liken metabolitleri primer ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılır. Primer metabolitler genellikle suda çözünürler ve amino asitler, karetenoidler, polisakkaritler ve vitaminler içerir. Sekonder metabolitler ise liken asitleri olarak adlandırılır, liken hiflerinin yüzeyine amorf formlarda veya kristaller halinde mikrobiyont tarafından üretilir, suda çözünmez organik çözücülerle izole edilebilirler. Sekonder metabolitler (depsidler, depsidonlar, usnik asitler, dibenzofuranlar, ksantonlar, antrakinonlar, pulvinik asit türevleri ve alifatik asitler, vb.) farmasötik öneme sahiptir ve yapılan çalışmalarda antibiyotik, antimikotik, antiviral, antiinflamatuar, analjezik, antipiretik, antioksidan, antiproliferatif, antianjyogenik, sitotoksik ve antikanser aktivite gibi birçok biyolojik özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir (35,245–247).

2.6.1.1. Liken Asitleri ve Kanser

Liken asitlerinin yapılan birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma sonucunda antioksidan, sitotoksik, proapoptotik, antiproliferatif, antimigratif, antiinvaziv özellikleri ile antikanser aktivite gösterdiği bilinmektedir (35–37). Liken asitlerinden özellikle fenolik bileşikler (antrakinonlar, ksantonlar, dibenzofuranlar, depsidler ve depsidonlar) makromoleküllerin oksidasyonunu inhibe ederek antioksidan aktivite gösterirler (35).

Literatürde mevcut çalışmalara bakıldığında, liken asitlerinin, kanser hücrelerinde sitotoksik özelliklerinin normal hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (248,249). Sitotoksik etki mekanizmalarına bakıldığında ise; kaspazlar, p53, Bax ve Bcl-2 gibi apoptotik yolağı düzenleyen genlerin ekspresyonlarında değişikliklere neden olarak, CDK'lar ile ilişkili mekanizmalarla hücre döngüsünü durdurarak, kanser progresyonunda temel olarak görev alan Wnt/ β-katenin sinyal yolunu inhibe ederek, kanserin progresyonunda görev alan RAS süper ailesi üyelerinin aktivitelerini azaltarak hücre proliferasyonun inhibisyonu, hücre ölümü (apoptoz, nekroz ve otofaji) indüksiyonu ve hücre hareketliliğinin inhibisyonu gibi mekanizmalarla antikanser aktivite sergiledikleri gösterilmiştir (35,36,250,251).

Malign mezotelyoma hücreleri (MM98), vulvar karsinom hücreleri (A431) ve keratinosit hücreleri (HaCaT) üzerinde beş liken asidi: usnik asit, salazinik asit, vulpinik asit, gyrophorik asit ve evernik asidin antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Yapılan sitotoksisite deneyleri sonucu usnik asidin yüksek, vulpinik asidin orta, salizinik, gyrophorik ve evernik asidin ise düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri gösterilmiştir (252).

İnsan GBM hücre hattında (U87MG) olivetorik asit, fizodik asit ve psoromik asidin *in vitro* sitotoksisite, antioksidan, prooksidatif ve genotoksisite potansiyelleri araştırılmıştır. Tüm metabolitlerin konsantrasyona bağlı sitotoksik ve genotoksik aktivitesi olduğu, düşük konsantrasyonlarda yüksek antioksidan aktivite, yüksek konsantrasyonlar da ise oksidatif stres kaynaklı sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (253).

Yapılan başka bir çalışmada, radyocerrahi tedavisinden sonra HPV genital enfeksiyonunun adjuvan tedavisi olarak bir çinko sülfat ve liken türevi olan usnik asit bileşiğinin intravajinal uygulamasının reepitelizasyonu hızlandırdığı ve rekürrensi azalttığı gösterilmiştir (254).

Meme kanseri hücre hattı (MCF-7), serviks kanser hücre hattı (HeLa) ve prostat kanser hücre hattı (PC-3)'nda usnik asit türevlerinin antikanser etkileri araştırılmıştır ve hücre

canlılığını inhibe ettiği özellikle HeLa hücre hattında belirgin inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. Çeşitli fazlarda hücre döngüsü inhibisyonuna da neden olduğu özellikle HeLa hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazlarında hücre döngüsünü durdurduğu ve çeşitli yötemlerle PARP'ın parçalanmasını arttırma ve Bcl-2 seviyelerinde azalma gibi proapoptotik özellikleri olduğu gösterilmiştir (255).

HeLa ve insan kolon karsinom hücre hattında (HCT116) liken sekonder metabolitlerinden olan lobarik asit ve lobarstinin antikanser aktivitesi çalışılmıştır. Hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu, hücre canlılığını belirgin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. PARP bölünmesini arttırarak ve Bcl-2 eskpresyonunu azaltarak apoptozu indüklediği de gösterilmiştir (256).

Serviks kanser (HeLa), nöroblastoma (SH-SY5Y) ve kronik miyeloid lösemi (K562) hücre hatlarında bir liken sekonder metaboliti olan protolichesterinik asidin, doksorubisinin antiproliferatif aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmış. Doksorubisinin, SH-SY5Y ve K562 hücrelerine karşı değil, HeLa hücre hattına karşı *in vitro* aktivitesi, protolichesterinik asit tarafından sinerjik olarak arttırıldığı, HeLa hücrelerinde protolichesterinik asidin neden olduğu artan sitotoksisitenin kaspas aktivasyonuna neden olarak apoptozu indüklemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve protolichesterinik asidin antikanser ilaçlarla kombinasyon tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (257).

Bu tez çalışması kapsamında çalışılacak liken asitleri:

Vulpinik Asit*: Letheria vulpina* liken türlerinden izole edilen likenlerin ikincil metabolitlerinden biri olan vulpinik asidin kimyasal formülü $C_{19}H_{14}O_5$'tir. Bu liken asidinin antimikrobiyal, antifungal ve antikanser (antianjiyogenik, antiproliferatif, proapoptotik, sitotoksik) aktivitelerinin olduğu bilinmektedir (258,259).

İnsan meme kanser hücreleri (MCF-7, MDA-MB231, BT474, SK-BR3) ve meme epitel hücresi (MCF-12A) üzerinde yapılan bir çalışmada vulpinik asidin hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Meme epitel hücresinde 2.5 kat, meme kanser hücresinde ise 14 kat p53 ekspresyonunu arttırarak apoptozu indüklediği görülmüştür (260).

Vulpinik asidin metastaik prostat kanseri hücrelerinin (PC-3) canlılığını azalttığı, hücre döngüsünü G0/G1 de durdurduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (258).

Kolorektal karsinom (CaCo2), hepatosellüler karsinom (HepG2), servikal kanser (Hep2C), rabdomyosarkom (RD) ve fibrosarkom (Wehi) gibi farklı kanser hücre hatlarında vulpinik asidin antikanser özellikleri gösterilmiştir. Bax, Bcl-2, p53 ekpresyon değişikliklerine bakılarak (Bax geninin tüm hücre dizilerinde Bcl-2 ve p53 genlerine göre daha fazla ekspresyon artışı olmuştur) kanser hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (261).

Vulpinik asit ve usnik asidin hepatokarsinom hücreleri (HepG2), nöroblastom hücreleri (NS20Y) ve endotel hücrelerinde (HUVEC) antianjiyogenik ve antiproliferatif özellikleri araştırılmıştır. Her iki liken asidinin de güçlü antianjiyogenik aktivite gösterdiği ve bu liken asitlerinin kanser hücrelerinde normal hücrelerden daha fazla sitotoksik etkileri olduğu görülmüştür. Vulpinik asidin usnik asite göre daha güçlü antianjiyogenik aktivite göstermesine rağmen daha düşük toksistesi olduğu, usnik asidin ise vulpinik asitten daha fazla antiproliferatif potansiyeli olduğu görülmüştür (262).

Yapılan başka bir çalışmada vulpinik asidin meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) ve kanserli olmayan meme epitel hücrelerinde (MCF-12A) apoptoz, hücre döngüsü ve MAPK yollarında rolleri olan 12 miRNA (miR-1268a, miR-132-3p, miR-155-5p, miR-16–1-3p, miR-196b-5p, miR-197-3p, miR-2861, miR-3923, miR-423-5p, miR-4291, miR-6740-5p and miR-769-5p)'nın ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. MCF-7 kanser hücrelerinde vulpinik asidin bu miRNA'ların ekspresyonunu inhibe ettiği, hücre proliferasyonunu baskıladığı, Bax protein ekspresyonunu arttırarak, Bcl-2, prokaspaz 3 ve 9 protein ekspresyonlarını ise azaltarak apoptoz sinyal yolağını indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca vulpinik asidin MCF-12A hücrelerinin canlılığı üzerinde önemli bir sitotoksik etkiye neden olmadığı görülmüştür (263).

Evernik Asit: Oakmos olarakta bilinen *Evernia prunastri*, esas olarak meşe ağaçlarının gövde ve dallarında yetişir, aynı zamanda köknar ve çam gibi diğer yaprak döken ağaçların ve kozalaklı ağaçların kabuğunda da bulunur. Evernik asit, *Evernia prunastri*'nin önemli bir bileşenidir, iki monoaromatik halkalı bir depsid sınıfı metabolitidir ve $C_{17}H_{16}O_7$ kimyasal formül yapısındadır. Antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuar, antikolinerjik ve antikanser özellikleri bilinmektedir (264–266).

Depsidler bir karboksilik veya ester grubu yan zincirine sahip bir veya daha fazla fenolik halka ile karakterize edilen bir polifenolik bileşik türüdür. Depsitlerin antimikrobiyal, antioksidan ve antiproliferatif etkileri iyi bilinmektedir. Prostoglandin sentezi ve lökotrien B4 biyosentezini inhibe ettikleri ve güçlü antiinflamatuar etkileri olduğu da bilinmektedir. Depsid

türlerinden atranorin, evernik asit ve difraktaik asit en iyi bilinenleridir. Yapılan bir çalışmada bu 3 liken asidinin antioksidan ve antienflamatuar aktiviteleri gösterilmiştir (266).

Evernik asit, usnik asit, atranorin ve fizodalik asidin insan prostat kanseri (22RV1), insan kolon kanseri (HT-29), insan hepatoselüler karsinoması (Hep-G2) ve hamster yumurtalık kanseri (CHO) hücre hatları üzerinde doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği ve hücre canlılığının kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda antioksidan ve antimikrobiyal aktivite sergiledikleri de gösterilmiştir (249).

İnsan melanomu (FemX) ve insan kolon karsinomu (LS174) hücre hatları üzerinde *in vitro* olarak evernik asit ve fizodik asidin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri gösterilmiştir (265).

İki glioblastoma multiforme hücre hattı (A-172 ve T98G)'nda evernik asit, salazinik ve usnik asidin sitotoksik aktiviteleri gösterilmiş, aynı zamanda antienflamatuar, antioksidan ve antikolinerjik özellikleri de araştırılmıştır. Evernik asit ve usnik asidin kan beyin bariyerini geçtiği de görülmüştür (264). Yapılan başka bir çalışmada ise evernik asidin Parkinson hastalığının *in vitro* ve *in vivo* modellerinde nöronları koruduğu ve astraglial aktivasyonu engellediği gösterilmiştir (267).

Difraktaik Asit: $C_{20}H_{22}O_7$ formül yapısına sahip difraktaik asit liken sekonder metaboliti bir depsit türevidir ve genellikle usnea, parmelia cinsi likenlerden izole edilen beyazımsı bir pigmenttir. Daha önce yapılan çalışmalarda difraktaik asidin antimikrobiyal, analjezik, antipiretik, antiproliferatif, sitotoksik, antioksidan ve mide koruyucu özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (268–271).

Brisdelli ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada, altı liken metabolitinin (difraktaik asit, lobarik asit, usnik asit, vicanisin, variolarik asit, protolichesterinik asit) meme kanseri hücre hattı (MCF-7), servikal hücre hatıı (HeLa) ve kolon karsinomu hücre hattında (HCT-116) yapılan çalışmada sitotoksik, antiproliferatif ve proapototik özellikleri gösterilmiştir. Yapılan sitotoksisite testleri sonucunda tüm kanser hücre hatlarında en güçlü sitotoksik etkiyi usnik asit ve protolichesterinik asit göstermiştir. Variolarik asidin hücre hatları üzerinde canlılığı etkilemediği, vicanisin ile muamelede HeLa ve HCT-116 hücrelerinde doza bağlı bir şekilde önemli bir canlılık kaybına neden olduğu, ancak MCF-7 hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermediği, difraktaik asit ile muamelede ise, HCT-116 hücrelerine karşı iyi bir antiproliferatif aktivite gösterirken, MCF-7 ve HeLa hücrelerinin canlılığındaki azalma daha yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiştir.

Protolichesterinik asidin HeLa hücrelerinde hücre büyüme ve canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve antiproliferatif etkilerini intrinsik ve ekstrinsik kaspas aracılı yolu aktive ederek apoptotik yolun aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (39).

Difraktaik asit, lobarik asit ve usnik asidin insan glioblastoma multiforme hücre hattı (U87MG) ve primer sıçan serebral korteks hücreleri (PRCC) üzerinde yapılan çalışmada sitotoksik ve antioksidan aktiviteleri olduğu gösterilmiştir (272).

Difraktaik asit ve usnik asidin insan keratinosit hücre hattında (HaCaT) keratinositlerinin büyümesine karşı güçlü antiproliferatif aktivite göstererek hücre büyümesine engel olduğu gösterilmiştir (273).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 7. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar ve kitler

Kimyasal Maddenin Adı	Temin Edilen Firma Adı
RPMI-1640 Medyum	Sigma-Aldrich
Fetal Sığır Serum (FBS)	HyClone
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich
Giemsa Boyası	Chembio
Trypan Blue Boyası	Sigma-Aldrich
Difraktaik Asit	Targetmol
Vulpinik Asit	Cayman Chemical Company
Evernik Asit	Cayman Chemical Company
XTT Cell Proliferation Assay Kit	Roche
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit	Biolegend
ThinCertTM 24 Well Cell Culture	Millicell
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Carl Roth
Tripsin_EDTA Solüsyonu	Sigma-Aldrich
PureLink™ RNA Mini Kiti	Invitrogen
cDNA Sentez Kiti (SuperScript™ III First-Strand Synthesis System)	Applied Biosystems
SYBR Green qPCR Master Mix	Bio-Rad
Primer	Oligomer
TrxR1 Primer Antikor	Santa Cruz Biotechnology
B-Aktin Primer Antikor	Santa Cruz Biotechnology
Sekonder Antikor (Rabbit Anti-Mouse IgG-HRP)	Santa Cruz Biotechnology
RIPA Buffer	Cell Signaling Technology
2-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Akrilamid	Sigma-Aldrich
Bisakrilamid	Sigma-Aldrich
Trisma Base	Sigma-Aldrich
Whatman Blotlama Kağıdı (Extra Thick Blot Paper)	Bio-Rad
Polivinilidin Diflorid Membran (PVDF)	Macherey-Nagel
Protein Marker	New England BioLabs

Clarity Max Western ECL Substrates	Bio-Rad
Clarity Western ECL Substrates	Bio-Rad
β-Nikotinamid Adenin Dinükleotid 2'-Fosfat	Sigma-Aldrich
Skim Milk Powder (Yağsız süt tozu)	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Fenilmetilsülfonil Flüorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Glisin	Sigma-Aldrich
Etanol	Isolab
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) İzopropil Alkol (2-propanol)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (HCI)	Sigma-Aldrich
Potasyum Klorür (KCI)	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCI)	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Coomassie-Brillant Blue G-250	Fluka
Amoyum Persülfat (APS)	Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albümin (BSA)	Sigma-Aldrich
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Sigma-Aldrich
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Sigma-Aldrich

3.2. Kullanılan Materyal ve Cihazlar

Tablo 8. Çalışma kapsamında kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

Materyal ve Cihaz Adı	**Firma Adı**
T-25 Flask (Filtreli, steril)	Labsolute
T-75 Flasklar (Filtreli, steril)	Labsolute/ Corning
15 mL'lik Santrifüj Tüpleri	Labsolute/ Isolab
50 mL'lik Santrifüj Tüpleri	Labsolute/ Isolab
Serolojik Pipetler (2, 5, 10, 25 ve 50mL)	Labsolute
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Pipet Uçları	Isolab
1,5-2 mL'lik Tüpler ve Raklar	Eppendorf
6 Kuyucuklu Plaka	Labsolute
24 Kuyucuklu Plaka	Labsolute
96 Kuyucuklu Plaka	Labsolute/ Greiner bio-one
Steril Petri Dish	Corning

Karbondioksitli Etüv (İnkübatör)	Nuaire Nu-4750
Etüv	Memmert
Buzdolabı (+4°C)	Uğur
Derin Dondurucu (-86°C)	New Brunwick Premium U410
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel FT 280, Siemens
Distile Su (dH_2O) Üretme Cihazı	mp MINI Pure
Çeker Ocak	Tolkim
Mikroplaka Spektrofotometresi	Epoch
Isıtıcı Bloğu	Lab Line
Mini Santrifüj	Aosheng 40
Hassas Terazi	Denver Instrument
Kar Üretme Cihazı	Scotsman
Güç Kaynağı	Thermo EC 135-90
pH Metre	Mettler Toledo
Magnetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A
Flow (Akım) Sitometri Cihazı	Beckman Coulter CytoFLEX
Nanodrop	Thermo Scientific Multiscan GO
Otoklav	HMC Hirayama
PCR	Bio-Rad C1000 Thermal Cycler
Strip Tüpler	Qiagen
Real-Time PCR	Qiagen
UV-VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter
Vial (Cryogenic Tubes)	Clearline
Sıvı Azot Tankı	Taylor- Wharton LS750 Lab System
Steril Kabin (Biyogüvenlik Kabin)	Nuaire 425-500E Esco Marka Class 2
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter
Sıcak Su Banyosu	Memmert
Ters (Inverted) Işık Mikroskobu	Zeıss Prımovert
Ultrasonikatör	Isolab
Vorteks	Wisd WiseMix VM-10/ Heidolph
Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	Bio-Rad
1.5 ve 3 mL'lik Kuvarz Küvetler	Merck
Cell Scraper (Hücre Kazıyıcı)	Labsolute

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Tablo 9. Çalışma kapsamında hazırlanan ve kullanılan çözeltiler

Çözeltinin Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
RPMI-1640 Komplet Besiyeri	RPMI-1640 bazal medyum içerisine %10'u kadar FBS, % 1'i kadar penisilin/streptomisin eklendi, +4 °C'de saklandı.
%70'lik Etil Alkol	70 mL etil alkol, 30 mL saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid	128 mL dH_2O içerisinde, 37.5 g akrilamid ve 1 g bisakrilamid 37 ºC'de çözdürüldü.
%10'luk SDS	1 g SDS, 9 mL saf su içerisinde çözdürüldü.
%10'luk APS	0.2 g APS ve 1.8 mL saf suda çözdürüldü.
Lizis Buffer (%1 2-Merkaptoetanol)	1 mL Lizis buffer üzerine 10 µL 2-Merkaptoetanol eklenerek hazırlandı (RNA izolasyonu için).
%5'lik Bloklama Çözeltisi	95 mL TBST içerisinde 5 g Skim Milk Powder (Yağsız Süt Tozu) çözdürüldü.
Bradford (Commassie Brillant Blue) Çözeltisi	100 mg Coomassie-Brillant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldükten sonra hacmi 1 L tamamlamak için 110 mL %85'lik fosforik asit çözeltisi eklendi. Alüminyum folyo ile kaplandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.
1X Lizis Tampon (1 mM PMSF içeren RIPA buffer)	RIPA buffer, 1/10 oranında dH_2O ile seyreltildikten sonra üzerine 1 mM PMSF ilave edilerek hazırlandı (protein izolasyonu için).
1X TBST Çözeltisi	100 mL 10X TBS, 900 mL dH_2O ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra 1 mL Tween-20 eklenerek hazırlandı.
1X Transfer Çözeltisi	100 mL 10X Transfer çözeltisine 200 mL metanol ve 700 mL saf su ilave edilerek hazırlandı.
1X SDS-PAGE Yükleme Tamponu	%10 (v/v) β-merkaptoetanol, 0.125 M Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 (v/v) gliserol ve %0.01 (w/v) bromfenol mavisi karıştırılarak hazırlandı. -20°C de muhafaza edildi.
10X TBS Çözeltisi	900 mL dH_2O içerisinde 80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris çözdürüldü. 1 M HCI ile pH=7.4'e ayarlanarak saf su ile hacim 1 L'ye tamamlandı.
10X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	%10'luk 100 mL SDS 'ye 30.2 g Tris, 188 g Glisin ve eklenerek 1 L saf su ile çözüldü.
10X Transfer Çözeltisi	900 mL saf su içinde 29 g Glisin, 58 g Tris, 3.7 g SDS çözüldü. pH=8.3' e ayarlandı, saf su ile hacim1 L' ye tamamlandı.
0.2 mg/mL BSA	1 mg BSA'ya saf su eklenerek hacim 5 mL'ye tamamlandı.
1 M Tris/ HCl Tamponu	900 mL distile su içinde 121.14 g Tris çözülerek 1 M HCl ile pH: 6.8'e ayarlandı ve distile su ile hacim1 L'ye tamamlandı.
1.5 M Tris/HCl Tamponu	1900 mL distile su içinde 81.7 g Tris çözülerek 1M HCl ile pH: 8.8'e ayarlandı ve distile su ile hacim 1L'ye tamamlandı.
100 mM K-fosfat/ 10mM EDTA tamponu	90 ml saf suda 6.8 g KH_2PO4 ve 0.374 g EDTA çözdürüldü. pH: 7'ye ayarlanarak saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.
0.2 mM NADPH çözeltisi	8.3 mg NADPH, saf su ile hacim 5 mL' ye tamamlandı.
5 mM DTNB çözeltisi	5 mL %98'lik etanolde 9.91 mg DTNB çözdürüldü.

3.4. Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında kullanılan insan servikal hücre hattı (HeLa) adını 1951 yılında serviks kenseri tanısı alan Henrietta Lacks'tan almıştır ve ilk insan hücre hattı olarak bilinmektedir. Henrietta Lacks'ın serviks kanserli dokusundan alınan örnek Dr.Gey ve ekibi tarafından hücre kültürü labaratuvarında çoğaltılmaya başlanmış, hücrelerin çok hızlı çoğaldığı ve ölümsüz olduğu görülmüş ve o zamandan beri biyolojik çalışmalarda en yaygın kullanılan insan hücre hattı haline gelmiştir (274,275).

HeLa hücre hattı için, RPMI-1640 bazal medyum içerisinde %10'u kadar FBS ve % 1'i kadar penisilin/streptomisin eklenerek komplet besiyeri hazırlandı. Komplet medyum içerisine konulan hücreler, 37 °C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilerek çoğaltıldı. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı pasajlandı, stoklanacak kısım ise dondurularak -80 °C'de saklandı. Ardından da -196 °C'deki sıvı azot tankına aktarıldı. Hücre kültürü çalışmaları Class II tip steril kabin içerisinde yapıldı ve kabin içerisine alınan her malzeme %70'lik etanol ile sterilize edildi.

3.4.1. HeLa Hücrelerin Çözdürülmesi

Sıvı azot tankında (-196 °C'de) stoklanmış HeLa hücreleri azot tankından çıkarılarak 37 ºC'lik su banyosu içerisinde çözüldü ve tüp %70'lik etanol ile steril edilerek steril kabin içerisine konuldu. Tüp içerisinden pipetle alınan HeLa hücreleri 5 mL RPMI komplet besiyeri içeren 15 mL'lik falkon tüp içine aktarıldı. 5 dakika boyunca 1300 rpm'de oda sıcaklığında santrifüjleme işlemi yapılarak hücrelerin dibe çökmesi sağlandı. Süpernatant aspire edilerek dibe çöken hücrelerin olduğu pelet üzerine 5 mL RPMI komplet besiyeri eklendi ve hücreler çözdürüldü. Daha sonra hücrelerin T25 kültür kaplarına (flasklara) ekimi sağlandı. 37 °C ve %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde büyütülen hücrelerin besiyerleri, her 2-3 günde bir, DPBS ($MgCl_2$ ve $CaCl_2$ içeren) ile yıkama yapılarak değiştirildi.

3.4.2. HeLa Hücrelerinin Pasajlanması

Hücreler %80-90 konfluensiye ulaştığında pasajlama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı;

- Kültür kaplarındaki eski medyum aspire edildi.
- Kültür kabında bulunan safsızlıklar, DPBS ($MgCl_2$ ve $CaCl_2$ içermeyen) ile yıkama yapılarak uzaklaştırıldı.
- Kültür kabındaki hücre tabakasının yüzeyini kaplayacak miktarda Tripsin-EDTA (%0.25) eklenerek 3-5 dakika (dk) inkübatörde bekletildi ve hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı.

- Kullanılan Tripsin-EDTA miktarının 3 katı kadar RPMI komplet besiyeri eklenerek tripsin inaktive edildi.
- Hücrelere 1300 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjleme işlemi yapıldı.
- Hücrelerin flasklara uygun sayıda ekimi yapılarak büyümeleri için 37 °C'de %5'lik CO_2 içeren inkübatörde bekletildi. Flaskların üzerine tarih, hücre hattının adı ve pasaj numarası yazıldı.

3.4.3. HeLa Hücrelerinin Dondurulması

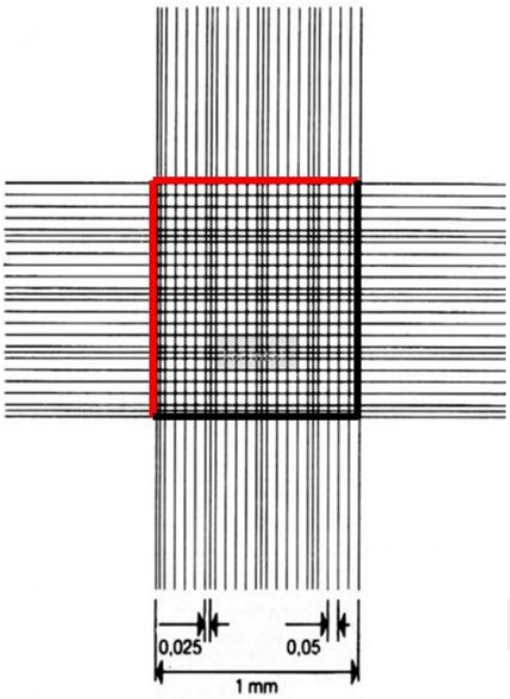
Stoklanacak hücreler, 2 mL'lik kriyo tüplerin içerisinde freezing (dondurma) besiyeri (komplet besiyeri içerisinde hazırlanan %5'lik DMSO) ile donduruldu. Kriyo tüpler, Mr. Frosty içerisine koyulduktan sonra -20 ºC'de 40-50 dk bekletildi. Daha sonra -80 ºC'ye ve ardından -196 ºC'deki sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.4.4. Hücre Sayımı

Hücre sayımı Invert (ters) mikroskop altında Thoma lamı kullanılarak yapıldı. Öncelikle mikrosantrifüj (eppendorf) tüp içerisine 100 µL hücre süspansiyonu ve 100 µL trypan blue (tripan mavisi) boyası eklenerek pipetaj yapıldı. Thoma lamının üst ve alt bölmelerine boya içeren hücre karışımından 10'ar µL alınarak aktarıldı. Trypan blue boyası, cansız hücrelerin içerisine girerek mavi renkte gözlenmesine neden olurken, canlı hücreler boyayı içerisine almadı ve parlak olarak gözlendi. Thoma lamında hücre sayımı yapılırken işaretli alan içerisinde bulunan hücrelerin sayımı şekilde gösterildiği gibi yapıldı. Kenardaki çizgi üzerinde de hücreler bulunur ise karşılıklı kenarlardan yalnızca biri alınarak hücrelerin sayımı yapıldı ve toplam hücre sayısına eklendi (Şekil 12). Invert mikroskop altında canlı hücrelerin sayımı yapıldı ve mL başına düşen hücre sayısı şu şekilde hesaplandı;

$$\text{Hücre sayısı/mL} = \text{sayılan ortalama hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

Dilüsyon (seyreltme) faktörü: Seyreltme faktörü 2 (100 µL hücre, 100 µL trypan blue) olarak alındı.
10^4: 0.1 mm^3' deki sayım sonucunu 1 mL' deki sayıya dönüştürmek için kullanılan sabit değer.



Şekil 12. Hücre sayımının yapıldığı Thoma lamı (276)

3.5. Liken Asitlerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılacak liken asitleri (vulpinik, evernik ve difraktaik asitleri) ticari olarak satın alındı. Bu liken asitlerini 25 mg/mL konsantrasyonunda stoklarını hazırlamak için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı. DMSO kullanılmadan önce içerisinden 5 dakika boyunca azot gazı geçirilerek DMSO içerisinde çözünmüş olan oksijen gazı uzaklaştırıldı. İstenilen konsantrasyonda liken asitlerinin DMSO içerisinde iyice çözünmesi için vortekslendi ve sonrasında +4 °C'de sonikatörde 10 dk boyunca bekletildi. DMSO içerisinde çözünen liken asitleri alikuatlara ayrıldı ve kullanılana kadar -20 °C'de saklandı.

3.6. Hücre Proliferasyon Analizi

Tez kapsamında çalışılacak olan liken asitlerinin (vulpinik, evernik ve difraktaik asit) HeLa hücre hattının proliferasyonu üzerine etkisi XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) yöntemi ile belirlendi. XTT testi, hücre çoğalma miktarının tespit edildiği enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan bir testtir. Bu yöntemde; proliferasyonu artmış hücreler, artan dehidrojenaz enzim aktivitesine bağlı olarak XTT tuzunun, turuncu renkli suda çözünebilen formazana dönüşümü ve bu renk değişiminin ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülerek tespit edilir (277). Bu amaçla aşağıdaki protokol takip edildi;

- Yeterli konfluensiye ulaşmış HeLa hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, 200 µL (7.500 hücre/kuyu) komplet besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonu 96'lık plakın her bir kuyucuğuna ekildi ve hücrelerin plaka yüzeyine yapışmaları için 37°C ve %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde bir gece bekletildi.
- Her bir kuyucuk, kültür mediumu uzaklaştırıldıktan sonra 100 µL DPBS tamponu ile yıkandı.
- Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin komplet besiyeri içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonlarından (10-100 µg/mL) 96'lık plaka içerisine 200 µL ilave edildi ve 37°C de %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde zaman bağımlı olarak (24 ve 48 saat) inkübe edildi. Kontrol grubu olarak sadece komplet besiyeri içeren hücreler kullanıldı.
- İnkübasyon sonrasında her kuyucuk 100 µL DPBS tamponu ile yıkandı. Ardından hazırlanan XTT solüsyonundan (5 mL XTT için 100 µL aktivatör) her bir kuyucuğa 50'şer µL konulup %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde 6 saat inkübe edildi.
- İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikroplate okuyucu spektrofotometre ile 470 nm absorbans değerinde ölçümleri yapıldı ve mikroskop görüntüleri alındı (278).

Hücre proliferasyonundaki azalma aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı;

% İnhibisyon = 100- [Abs (liken asidi ile muamele görmüş hücreler) – Abs (hücresiz ortamdaki liken asidi)] / [Abs (kontrol grubu hücreler) - Abs (hücresiz ortam)] X100

GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA) istatistik programı kullanılarak her bir liken asidinin IC_{50} değeri hesaplandı. IC_{50} değeri, hücre proliferasyonunu %50 azaltmak için gereken liken asitlerinin konsantrasyonudur. Bundan sonraki süreçlerde muamele grubu hücre hatları için bu konsantrasyonlar kullanıldı (279).

3.7. Apoptoz Testi

Annexin V boyası, hücre zarının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücreleri görünür hale getiriler. Aynı boya nekrotik hücrelere de bağlanabilir bu yüzden ayrım yapılabilmesi için ikinci bir boya olarak propidyum iyodür (PI) kullanılmaktadır. PI, sadece sızdıran nekrotik hücrelerin DNA'sını boyayarak apoptotik ve nekrotik hücreler arasında bir ayrıma izin verir. Annexin V ile boyanan PI ile boyanmayan hücreler erken apoptozun göstergesidir. Apoptotik sürecin devam etmesiyle hücreler nekroza gider ve PI ile de boyanır. Annexin V ve PI ile boyanma geç apoptoz ve nekrozun göstergesidir (280). Bahsi geçen liken asitlerinin HeLa hücrelerindeki apoptotik ve nekrotik olayların tespiti için Annexin V FITC-PI kiti kullanıldı. Hücreler Annexin V ve PI boyaları ile muamele

edildikten sonra hangi oranda apoptoza ve nekroza gittiği flow (akım) sitometresi ile belirlendi. Sayımı yapılan hücreler komplet besiyeri içerisinde 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 2'şer mL (150.000 hücre/mL) olacak şekilde ekildi ve %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde 37 °C'de bir gece bekletildi. Bir gece bekletildikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk 1 mL DPBS ile yıkandı ve DPBS tekrar uzaklaştırıldı. Her bir liken asidi taze komplet besiyeri içerisinde daha önce belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarında hazırlandı ve 6 kuyucuklu plakalara eklendi. %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde 37°C de 48 saat inkübe edildi. Kontrol grubu hücrelere DMSO içeren (liken asitlerinin IC_{50} konsantrasyonunun içerdiği oranda) besiyeri eklendi. İnkübasyonlar bittikten sonra besiyeri uzaklaştırılarak sonraki basamaklarda apoptotik ve nekrotik hücrelerin oranını tespit etmek için flow sitometri cihazı ile Annexin-V-FITC-PI boyama kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü uygulandı (278,281,282).

- Hücrelerin zaman bağımlı olarak inkübe edildikten sonra kontrol ve muamele gruplarındaki besiyerleri 15 mL'lik falkon tüplere alındı.
- 0.5 mL DPBS ile kuyucuklar yıkandı ve DPBS de 15 mL'lik falkonlara alındı.
- 0.3 mL tripsin-EDTA her bir kuyucuğa eklendi ve 37 °C ve %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde 3-5 dk inkübe edildi ve kuyucuklardaki hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra komplet besiyeri eklenip hücreler 15 mL'lik falkona toplandı.
- 1300 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrası sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- Her bir falkona 0.5 mL soğuk DPBS eklendi, nazikçe pipetaj yapıldı, santrifüjlendi ve santrifüj sonrası sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- Bir önceki basamak tekrarlandı ve böylece 2 kez DPBS ile yıkanması sağlandı.
- Her bir 15 mL'lik falkona 100 µL Annexin V Binding Buffer eklendi.
- Her bir 15 mL'lik falkona 2.5 µL FITC Annexin V ve 5 µL Propidium Iodide (PI) boyası eklendi, nazikçe pipetaj yapıldı.
- Karanlıkta 15 dk boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında her bir falkona 400 µL Annexin V Binding Buffer eklendi.
- Flow sitometri cihazı kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesi belirlendi (278,283).

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi GraphPad Prism Software istatistik programı kullanılarak yapıldı ve Unpaired t-testi ile p değerleri belirlendi: $p>0.05$=ns (not significant) önemsiz, *$p<0.05$= (önemli, significant) önemli, **$p<0.01$= (very significant) çok önemli, ***$p<0.001$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

3.8. Transwell Migrasyon Testi

Liken asitlerinin HeLa hücre hattında migrasyon üzerine etkisi Transwell migrasyon insert analizi kullanılarak karşılaştırıldı. Serum içermeyen 500 µL besiyeri içerisinde HeLa hücresi süspanse edildi ve her bir insert içerisinde 50.000 hücre olacak şekilde iki tekrarlı ekim yapıldı. İnsertler 24 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına yerleştirildi ve %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra insert membranı üzerinde kalan hücreler pamuk çubuk kullanılarak uzaklaştırıldı, 8 µm'lik gözeneklerden geçerek filtrenin alt yüzeyine göç eden hücreler fikse edildi. % 0.3 kristal viyolet ile boyanarak görüntülendi ve sayım işlemi yapıldı.

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi GraphPad Prism Software istatistik programı kullanılarak yapıldı ve Unpaired t-testi ile p değerleri belirlendi: $p>0.05$=ns (not significant) önemsiz, *$p<0.05$= (önemli, significant) önemli, **$p<0.01$= (very significant) çok önemli, ***$p<0.001$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

3.9. Kantitatif Gen Ekspresyon Analizi

HeLa hücreleri üzerine daha önce vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitleri için belirlenen IC_{50} konsantrasyonu ve uygulama süresi uygulanarak muamele grubu oluşturuldu. Kontrol grubu olarak ise liken asitleri yerine besiyeri eklenmiş HeLa hücre hattı kullanıldı.

3.9.1. Total RNA İzolasyonu

Sayımı yapılan hücreler 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 2 mL ($1.5x10^5$ hücre/mL) eklendi. Daha sonra yapışmaları için %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde 37°C'de %60-70 konfluensiye ulaşana kadar bekletildi. İnkübasyon bitiminde besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar DPBS ile yıkandı ve sonrasında DPBS de uzaklaştırıldı. Taze komplet besiyeri içerisinde belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarında hazırlanan liken asitleri muamele grubu olarak 6 kuyucuklu plakalara 2 mL olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak eklenip %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Kontrol grubuna ise sadece taze komplet besiyeri eklendi. Daha sonra, besiyeri aspire edilip DPBS ile yıkama yapıldı ve hücrelerin bulunduğu kuyucuklara 600 µL lizis tamponu (her bir 1mL lizis tampon için 10 µL β-merkaptoetanol) ilave edildi. Kuyu içerisinde pipetleme yapılarak hücreler bir araya toplandı ve 1.5 mL'lik mikrosanrifüj tüp içerisine alındı (284). Total RNA izolasyonu için PureLink™ RNA mini kiti kullanıldı ve üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre total RNA izolasyonu aşağıdaki gibi yapıldı.

- 1.5 mL'lik mikrosanrifüj tüpe alınan hücreler vortekslenerek 12.000 g'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüjlendi ve süpernatant RNase free tüpüne alındı
- 600 µL %70 etanol (1:1 oranında) süpernatant üzerine eklenerek vortekslendi.
- 700 µL (süpernatant + etanol) spin kolona eklendi.
- 12.000 g'de 15 saniye (s) oda sıcaklığında santrifüj yapılarak kolonun altında kalan sıvı uzaklaştırıldı ve geriye kalan süpernatant + etanol (500 µL) kolona eklenerek 12.000 g'de 15 s oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Ardından altta kalan sıvı tekrar uzaklaştırıldı.
- 700 µL Wash Buffer I eklendi. 12.000 g'de 15 s oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Çöken sıvı ve tüp atılarak kolon yeni bir collection tüp içine yerleştirildi.
- 500 µL Wash Buffer II eklendi. 12.000 g'de 15 s oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Bu basamak tekrarlandı.
- 12.000 g'de 2 dk oda sıcaklığında kolona birşey eklemeden boş bir şekilde santrifüj yapıldı. Ardından collection tüp atıldı.
- 1.5 mL'lik ependorf içine kolon yerleştirildi. 50 µL RNase içermeyen su ilave edilerek 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 13.000 g'de 2 dk oda sıcaklığında santrifülendi
- Tüm örneklerden elde edilen total RNA'lar -80 °C de muhafaza edildi.

3.9.2. Total RNA'ların Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi

Nükleik asitler yapılarındaki pürin ve pirimidin bazlarının UV ışığı 260-280 nm'de absorbe etmelerinden dolayı spektrofotometrik yöntemler kullanılarak kantitatif tayinleri belirlenmektedir. Elde edilen DNA örneklerinde A260/A280 oranı yaklaşık olarak 1.8 olması ve RNA örneklerinde ise A260/A280 oranının yaklaşık olarak 2.0 olması yapılan saflaştırma işleminin etkinliğini ve saflığını göstermektedir (285). HeLa hücreleri izole edilen total RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonları her bir örnek için nanodrop cihazı yardımı ile spektrofotometrik olarak belirlendi .

3.9.3. Total RNA Örneklerinden cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması

İzole edilen total RNA örneklerinden High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits sistemi kullanılarak cDNA sentezlemek için üretici firmanın tavsiye ettiği ve aşağıda belirtilen protokol takip edildi.

- Kit içerisindeki bütün bileşenler buz üzerinde çözdürülür.
- 2X RT Master Mix hazırlamak için aşağıdaki ürünler kullanıldı;

- 10XRT Buffer 2 µL
- 25XdNTP Mix (100mM) 0.8 µL
- 10XRT Random Primer 2 µL
- MultiScribe™ Revers Transkriptaz 1 µL
- Nükleaz-içermeyen H_2O 4.2 µL

- Hazırlanan karışım buz üzerine alınırak hafifçe karıştırıldı. 2X RT Master Mix'ten 10 µL minisantrifüj tüplerine konuldu.
- Tüm örneklerden elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları 0.02 - 2 µg arasında olacak şekilde birbirine eşitlendi ve 10 µL RNA örneğinden konularak pipetlendi.

Mini santrifüj ile spin yapılıp 25°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de ∞ inkübe edildi. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra örneklerinin saflığı ve konsantrasyonları her bir örnek için nanodrop cihazı yardımı ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Real Time PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.9.4. Real-Time PCR

Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi için Real-Time PCR analizi yapıldı. Kontrol ve liken asitleriyle muamele edilmemiş HeLa hücrelerinden izole edilmiş olan total RNA'dan revers transkriptaz enzimi yardımıyla hazırlanan cDNA'lar kullanıldı. SYBR Green yöntemi kullanılarak liken asitlerinin Bax, Bcl-2 ve TrxR1 genlerinin kantitatif ekspresyonu üzerine etkileri belirlendi. Sonuçlar beta aktin (β-Aktin) housekeeping geninin ekspresyonuna göre normalize edildi. Bahsedilen genler ve β-Aktin için primer dizileri, bağlanma (Tm) sıcaklığı ve %G-C oranı tablo 10'da belirtilmiştir (286).

Tablo 10. Real Time PCR ile kantitatif gen ekspresyon profillerine bakılan genler için primerlerin listesi

Gen Adı	Primer	Primer Dizisi (5'→3')	Tm Sıcaklığı (°C)	% GC Oranı
Bax	Forward	CAGGAAGTGGAAAGGTGGAG	59.69	55.00
	Reverse	CTCAGGATGAAGACCCGAAG	59.80	55.00
Bcl-2	Forward	TTGTAGTGTGTATGCCCTGCTT	59.70	45.45
	Reverse	TCCTCTGTGATGCTGAAAGGT	59.86	47.62
TrxR1	Forward	TTTGGTAAACGGATGGCTTC	59.94	45.00
	Reverse	AGGAAAGAACACGGGACAGA	59.70	50.00
β-Aktin	Forward	TGCTATCCCTGTACGCCTCT	59.86	55.00
	Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGA	59.86	50.00

SYBR Green yöntemi ile Real-Time PCR'da gen ekspresyonuna bakılacak ilgili bölgenin amplifiye edilmesi esnasında oluşan ürüne yeşil floresan boyanın bağlanması ve belirli dalga boyunda ışıma yaparak absorbans vermesi esasına dayanır. Real-Time PCR reaksiyon karışımına; cDNA (100 ng-100 fg), her bir primerden 0.3-0.5 µM, Syber Green master miksten 10 µL eklendi ve nükleaz free su ile toplam hacim 20 µL'ye tamamlandı. Tablo 11'daki PCR protokolü takip edildi.

Tablo 11. SYBR Green Real Time PCR protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	30	1
Denatürasyon	95	5	40
Primer Bağlanma Basamağı	57	30	40
Primer Uzama Basamağı	72	20	40

3.9.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiki Analizler

Real Time PCR sonrası kontrol ve muamele grupları için elde edilen CT değerlerine göre Livak Metotu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) kullanılarak istatiki analiz yapıldı (287).

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi GraphPad Prism Software istatistik programı kullanılarak yapıldı ve Unpaired t-testi ile p değerleri belirlendi: $p>0.05$=ns (not significant) önemsiz, *$p<0.05$= (önemli, significant) önemli, **$p<0.01$= (very significant) çok önemli, ***$p<0.001$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

3.10. Western Blot Yöntemi ile Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi

3.10.1. HeLa Hücresinden Proteinin Homojenatının Hazırlanması

HeLa hücre hattı, hücre kültürüne uyumlu steril petri kabına 10 mL komplet besiyerinde $1.5x10^6$ hücre olacak şekilde ekildi. 37°C %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. %60-70 konfluensiye ulaştığında besiyeri aspire edildi ve petri kabı 2 mL DPBS ile yıkandı. Muamele grubu olarak, taze komplet besiyeri içerisinde ve daha önce belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarında hazırlanan 10 mL liken asitleri petri kabına eklendi. 37°C' de %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde 48 saat inkübe edildi. Kontrol grubuna ise sadece komplet besiyeri ilave edildi. İnkübasyon tamamlanınca besiyeri aspire edildi ve soğuk DPBS tamponu ile yıkama yapıldı. Buz üzerine konulan petri kabına 500 µL 1X lizis tampon (1 mM

Fenilmetilsülfonil Flüorid (PMSF) içeren RIPA buffer) eklendi. Buz üzerinde 5 dk bekletildi ve kazıyıcılar (cell scraper) yardımıyla hücreler petri kaplarından kazınarak 1.5 mL'lik ependorf tüplerde toplandı. Vortekslendi, +4°C'de sonikatörde kısa süreli parçalama yapıldı ve 14.000 g'de 10 dk +4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant dikkatli bir şekilde pipetle alınarak alikuatlara ayrıldı ve -80°C'de saklandı (288).

3.10.2. Bradford (Commassie Brillant Blue) Yöntemi ile Protein Tayini

Homojenat veya hemolizat içerisindeki total proteinin kantitatif miktarının belirlemek için kullanılan yöntemlerden birisi olan Bradford yöntemi, negatif yüke sahip Commassie brillant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının proteinler üzerindeki pozitif yüklü aminoasitlere bağlanarak kırmızı rengin mavi renge dönüşmesine dayanan bir yöntemdir. Farklı konsantrasyondaki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Proteinin miktarına bağlı olarak mavi rengin şiddeti artmaktadır. Bradford yöntemi boyaya bağlanmış proteinin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesine karşın bu değeri tek başına bilmek bize protein miktar hakkında pek bilgi vermez. Bu sebeple absorbansı karşılaştırabileceğimiz bir standarta ihtiyaç duyulur. Bunun için protein konsantrasyonu belirli aralıklarla arttığı protein standartı çözeltisi hazırlanır ve absorbsiyon değerlerine bakılarak bir standart grafik çizilir. Bu amaçla sıklıkla sığır serum albumini (BSA) kullanılır. Derişimi bilinmeyen proteinlerin absorbansları grafikte yerine konularak ilgili proteinlerin derişimleri değersel olarak hesaplanır. Bu yöntem kullanılarak oldukça geniş bir aralıkta protein tayinini kolay ve hassa bir şekilde yapmak mümkündür.

Liken asitleri ile muamele edilen (muamele grubu) ve edilmeyen (kontrol grubu) HeLa hücre hattından elde edilen homojenatlardaki protein tayini için Tablo 12'deki protokole göre pipetleme yapılarak Bradford (Commessie Blue) yöntemi uygulandı (289,290). Hazırlanan deney tüpleri vortekslendikten sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek 595 nm' de absorbansı ölçüldü.

Tablo 12. Bradford protein tayini deney protokolü

Kimyasallar	Commessie Blue Boyası (µL)	dH_2O (µL)	Homojenat (µL)
Kör	4900	100	-
Örnek	4900	90	10

3.10.3. SDS Jelinin Hazırlanması ve Yüklenmesi

Hangi yüzdelik jeli hazırlamamız gerektiği deneyin amacına ve kullanılan proteinin moleküler ağırlığına göre belirlenir. SDS Jeli protein homejatındaki proteinlerin molekül büyüklüğüne göre fragmentlere ayrıldığı ayırma jeli ve numunenin yüklendiği yükleme jeli olarak iki kısımdan oluşur. Bu çalışmada, ayırma jeli olarak %12'lik SDS-PAGE jeli tablo 13'e göre hazırlandı. Yükleme jeli olarak ise%4'lük SDS-PAGE jeli tablo 14'e göre hazırlandı. Bardford yöntemiyle proteinlerin konstantrasyonları belirlendi. Her bir örnekten 40 µg protein 1X SDS-PAGE yükleme tamponu içinde total hacim 15 µL olacak şekilde hazırlandı. Yükleme jeline yüklemeden önce 95 ºC ısıtma blokunda 10 dk proteinler denatüre edildikten sonra numuneler 10 dk boyunca buz üzerinde bekletildi. Denatüre olan örnekler yükleme jeline yüklendikten sonra ilk olarak 80 Voltta yaklaşık 15 dakika elektroforezde yürütüldü. Numune ayırma jeline geçmeye başladığında ise voltaj 150 Volta çıkıldı ve 60 dakika daha yürütmeye devam edildi (286).

Tablo 13. SDS Jel Elektroforezi için kullanılan ayırma jeli değerleri

Jel Yüzdesi	**%8 (mL)**	**%9 (mL)**	**%10 (mL)**	**%12 (mL)**	**%14 (mL)**
%30 Akrilamid-Bisakrilamid	4	4.5	5	6	7
1.5M Tris pH:8.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
%10 SDS	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
%10 APS	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
TEMED	0.009	0.075	0.006	0.006	0.006
Didestile Su	6.9	6.45	5.9	4.9	3.9
Toplam	**15**	**15**	**15**	**15**	**15**

Tablo 14. SDS-PAGE Jel Elektroforezi için kullanılan yükleme jeli değerleri

Jel Yüzdesi	**1 mL**	**2 mL**	**3 mL**	**4 mL**	**5 mL**
%30 Akrilamid-Bisakrilamid	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83
1.5M Tris pH:8.8	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63
%10 SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
%10 APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
Didestile Su	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4

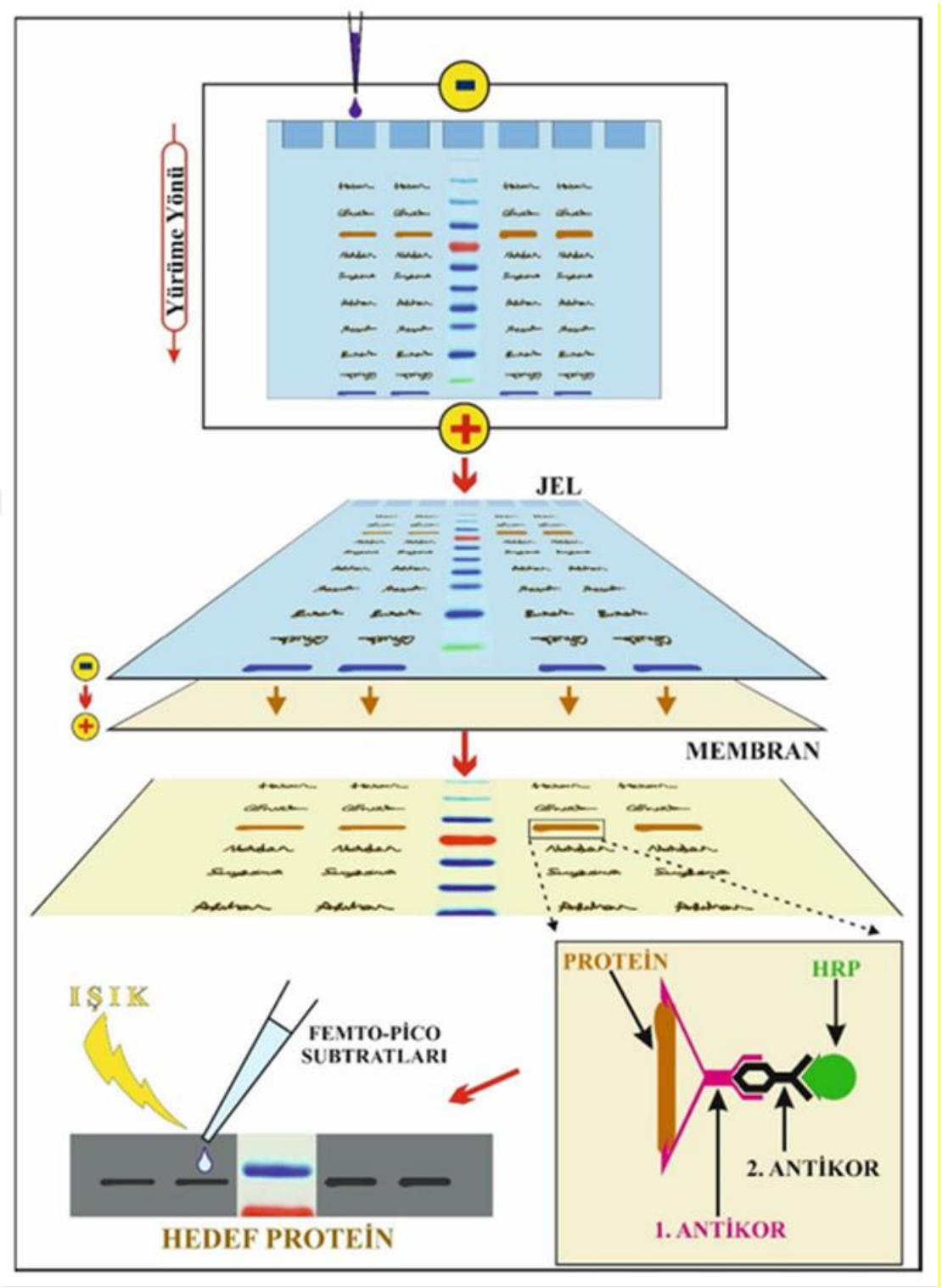
3.10.4. Jel Üzerinde Fragmentlere Ayrılan Proteinlerin Membrana Transfer Edilmesi (Blotlama), Bloklanması ve Görüntülenmesi

Protein homojenatındaki proteinler SDS-PAGE ile fragmentlere ayrıldıktan sonra PVDF (polyvinylidene difluoride) membrana transferi blotlama cihazı ile yapıldı. Bu süreçte aşağıdaki protokol takip edildi.

- Jel boyutunda kesilen PVDF membran kullanılmadan önce ilk olarak metanol ve sonrasında buz gibi soğuk (ice cold) 1X Transfer Buffer ile 5'er dakika muamele edildi
- Blotlama cihazı içerisine sıra ile 1 parça blotlama kâğıdı, PVDF membran, jel, 1 parça blotlama kâğıdı konuldu. Arada kalabilecek hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra 2.5 Amper, 25 Volt'da 7 dk'da proteinler blotlandı.
- Blotlama sonrasında membran 2 kez 10 dk 1X TBST ile yıkandı.
- Membran 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi (1X TBST ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu) ile muamele edildi.
- Membran 4 ºC'de 1 gece bloklama çözeltisi içerisinde seyreltilmiş primer antikorlar ile inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında membran oda sıcaklığında 5 kez 5 dk boyunca 1X TBST ile yıkandı.
- Membran 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi içerisinde seyreltilmiş sekonder antikor ile inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında membran oda sıcaklığında 5 kez 5 dk boyunca 1X TBST ile yıkandı.
- Antikorun kimyasal sinyal oluşturmasını sağlamak amacıyla ECL reagent substratları (BIORAD, Clarity Max Western ECL Substrate/Clarity™ Western ECL Substrate) kullanıldı.
- Membranın kemilüminesans görüntüsü ChemiDocTM Touch Imaging System cihazı kullanılarak elde edildi. Bu tez çalışmasında kullanılan antikorlara ait bilgiler tablo 15'de verilmiştir. Western blot yöntemi şekil 13'de özetlenmiştir.

Tablo 15. Western blot çalışması için kullanılan antikorlara ait bilgiler

		Jel yüzdesi	Seyreltme oranı	Antikor ile inkübasyon süresi	Protein büyüklüğü
Primer antikor	Trx.R1	%12	1:1000	+4ºC'de 1 gece	55 KDa
	β-Aktin	%12	1:1000	+4ºC'de 1 gece	43 KDa
Sekonder Antikor	Rabbit anti Mouse		1:10.000	1 saat oda sıcaklığında	



Şekil 13. Western blot yönteminin şematik gösterimi (291).

ImageJ software programı kullanılarak western blot sonrası elde edilen kemilüminesans sinyal yoğunluğunun kantitatif analizi gerçekleştirildi. Hedef protein, β-aktine karşı normalize edildi ve deneyler 3'er kez tekrarlandı. GraphPad Prism Software istatistik programı kullanılarak sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı ve Unpaired t-testi kullanılarak p değerleri belirlendi. $p>0.05$=ns (not significant) önemsiz, $p<0.05$=* (significant) önemli, $p<0.01$=** (very significant) çok önemli, $p<0.001$=*** (highly signifiant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi. (290,292)

3.11. Tiyoredoksin Redüktaz 1 Enzim Aktivite Ölçümü

Tiyoredoksin Redüktaz 1 (TRXR1), DTNB'deki (5.5-dithiobis-2-nitrobenzoik asit) disülfid bağlarının indirgenmesini NADPH'ye bağlı olarak katalize ettiğinden, TRXR1 enzim aktivitesini ölçmek için DTNB yöntemi kullanıldı (293).



Enzim aktivitesi ölçümünde RIPA buffer ile lizis edilen taze protein homojenatları kullanıldı ve kullanılan pipetleme prosedürü Tablo 16'da verildi. Deneyde 1000 µL'lik küvetlere; 100 mM potasyum fosfat (pH=7), 10 mM EDTA tamponu (pH=7), 0.2 mM NADPH, 0.2 mg/mL sığır serum albumin (BSA), 5 mM DTNB eklendi. Son olarak küvetlere örnekler (20 µL) 25 °C'de eklendi ve 412 nm'de absorbans artışı belirlenerek spektrofotometre ile kaydedildi. Küvet spektrofotometreden çıkarılmadan 3 dakika boyunca her 60 saniyede bir aktivite ölçümü yapıldı. Ardından 1 dakikada harcanan DTNB miktarı Lambert-Beer denklemi kullanılarak belirlendi (294).

Tablo 16. TRXR1 enzim aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

Bileşen	**Kör (µL)**	**Numune (µL)**
10 mM K-fosfat/ 10 mM EDTA tamponu	200	200
dH2O	570	470
Sığır Serum Albumin (0.2 mg/mL)	100	100
DTNB (5 mM)	100	100
Homojenat	30	30
NADPH (0.2 mM)	-	100

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi GraphPad Prism Software istatistik programı kullanılarak yapıldı ve Unpaired t-testi ile p değerleri belirlendi: p>0.05=ns (not significant) önemsiz, *p<0.05= (önemli, significant) önemli, **p<0.01= (very significant) çok önemli, ***p<0.001 (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

Enzim aktivitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Enzim Aktivitesi } (E\text{Ü}/mL) = \frac{\Delta OD}{14{,}15} \times \frac{Vt}{Ve} \times Sf \times \frac{1}{2}$$

EÜ/mL: 1 mL'deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbans değişimi

14.15: Ekstinksiyon katsayısı

V_T: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

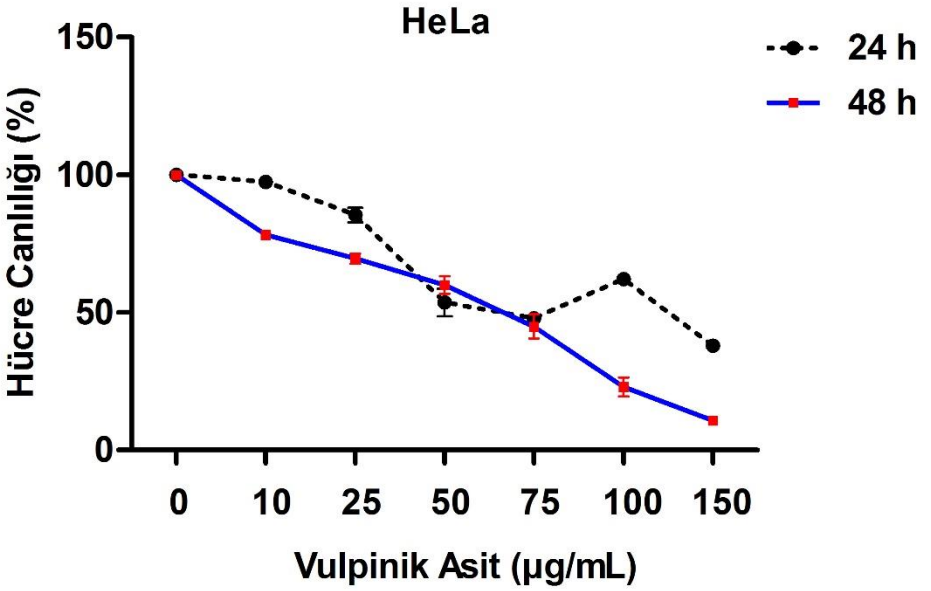
V_E: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

Sf: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. HeLa Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Uygulanması ve IC_{50} Değerlerinin Hücre Proliferasyon Analizi (XTT) ile Belirlenmesi

Bu çalışmada tıbbi öneme sahip birçok liken asidi içerisinden vulpinik asit, evernik asit ve difraktaik asidin insan servikal (HeLa) kanser hücre hattı üzerindeki doz ve zaman bağımlı antiproliferatif etkileri doğal veya sentetik bileşiklerin antiproliferatif potansiyellerini belirlemek için sıklıkla kullanılan XTT kolorimetrik testi ile incelendi. Hücre canlılığını yarıya düşüren IC_{50} her bir liken asidi için hesaplandı.



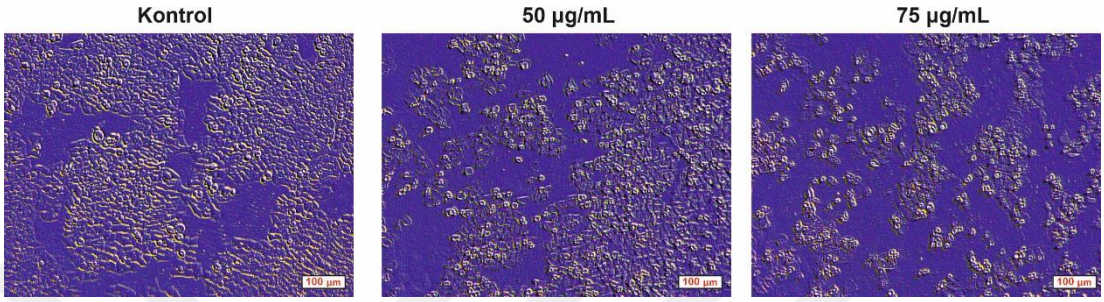
Şekil 14. Vulpinik Asidin HeLa Hücre Hattında, Hücre Canlılığına Etkisi

Vulpinik asidin HeLa kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif (sitotoksik) etkisi, doz (10-150 µg/mL) ve zaman (24 ve 48 saat (h)) bağımlı olarak hücre proliferasyon (XTT) testi ile değerlendirildi. Vulpinik asit, HeLa kanser hücre hattı üzerinde hem 24 saatlik hem de 48 saatlik uygulama sonrasında birbirine yakın düşük dozlarda (<100 µg/mL) antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 14).

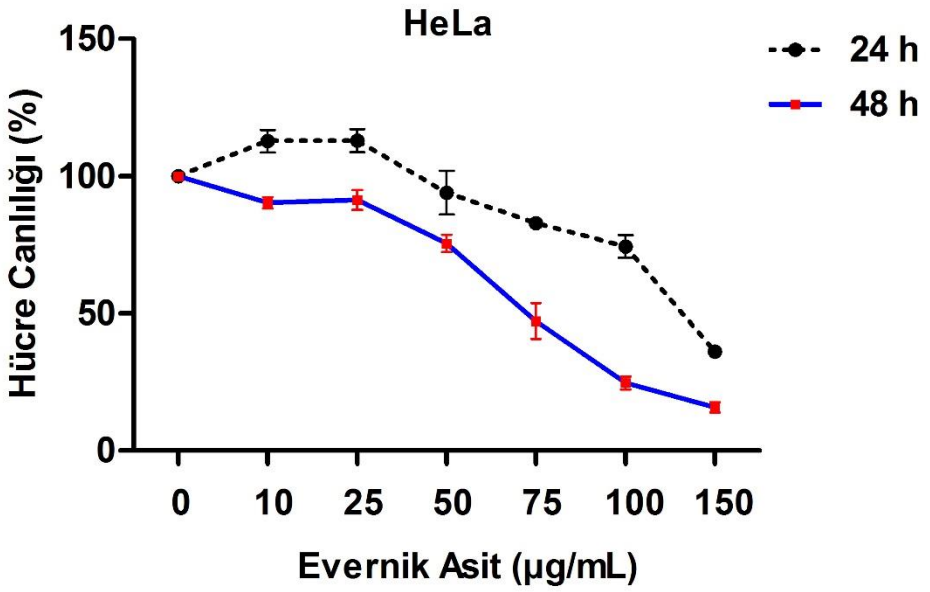
HeLa hücre hattında vulpinik asidin 24 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 64.28±4.54 µg/mL ve 48 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 66.53±4.03 µg/mL olarak belirlendi (Tablo 17). Vulpinik asit için belirlenen IC_{50} değerinin alt ve üst dozlarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 15'de verilmiştir.

Tablo 17. Vulpinik Asidin HeLa Hücre Hattı Üzerinde Belirlenen IC_{50} (µg/mL) Değerleri

	HeLa IC_{50} (µg/mL) değerleri	
Liken Asidi	**24. saat**	**48. saat**
Vulpinik asit	64.28±4.54	66.53±4.03



Şekil 15. Vulpinik asidin, HeLa hücre hattında 48 saatlik mumele sonucunda canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi. Ölçek: 100 µm.



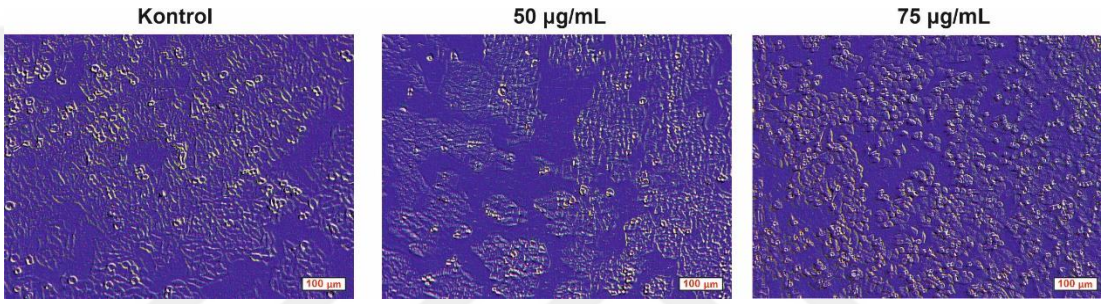
Şekil 16. Evernik Asidin HeLa Hücre Hattında, Hücre Canlılığına Etkisi

Evernik asidin HeLa hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi, doz (10-150 µg/mL) ve zaman (24 ve 48 saat (h)) bağımlı olarak hücre proliferasyon (XTT) testi ile değerlendirildi. Evernik asit, HeLa hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında yüksek dozlarda (>100 µg/mL) antiproliferatif etki gösterirken, 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise daha düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdi (Şekil 16).

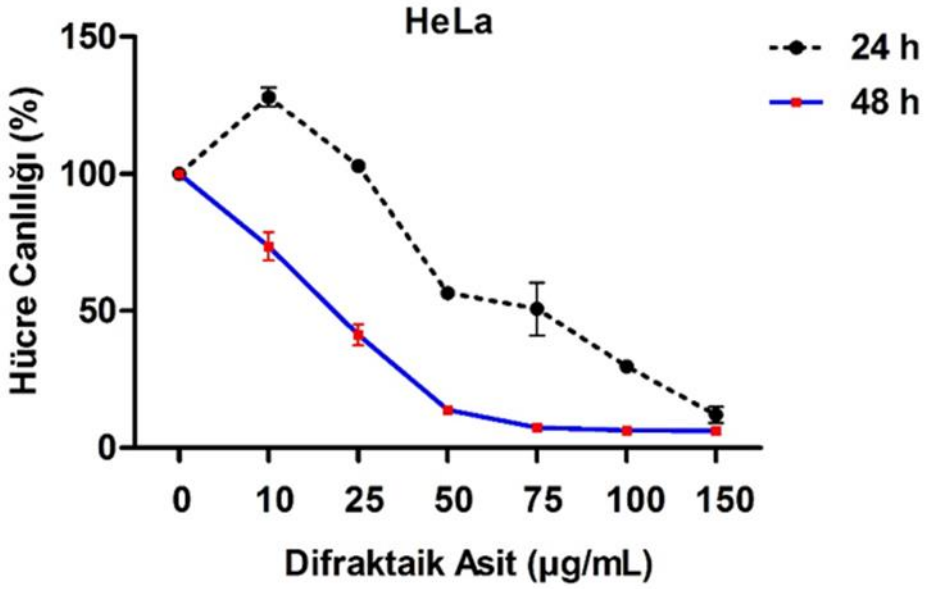
HeLa hücre hattıyla evernik asidin 24 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 129.87±1.64 µg/mL ve 48 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 70.26±1.49 µg/mL olarak belirlendi (Tablo 18). Evernik asit için belirlenen IC_{50} değerinin alt ve üst dozlarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 17'da verilmiştir.

Tablo 18. Evernik asidin HeLa hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} (µg/mL) değerleri

	HeLa IC_{50} (µg/mL) değerleri	
Liken Asidi	**24. saat**	**48. saat**
Evernik Asit	129.87±1.64	70.26±1.49



Şekil 17. Evernik asidin, HeLa hücre hattında 48 saatlik mumele sonucunda canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi. Ölçek: 100 µm.

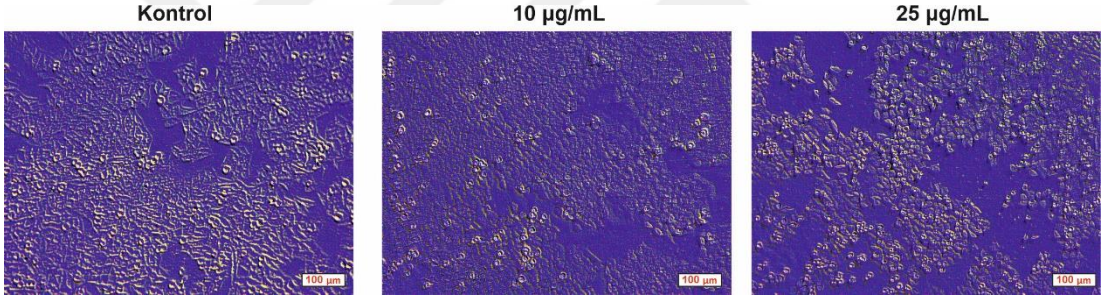


Şekil 18. Difraktaik Asidin HeLa Hücre Hattında, Hücre Canlılığına Etki

Difraktaik asidin HeLa hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi, doz (10-150 µg/mL) ve zaman (24 ve 48 saat (h)) bağımlı olarak hücre proliferasyon (XTT) testi ile değerlendirildi. Difraktaik asit, HeLa hücre hattı üzerinde hem 24 saatlik hem de 48 saatlik uygulama sonrasında düşük dozlarda (<100 µg/mL) antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 18). HeLa hücre hattında difraktaik asidin 24 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 72.26±2.72 µg/mL olarak belirlenmesine karşın 48 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 22.52±2.24 µg/mL olarak çok daha düşük olarak belirlenmiştir (Tablo 19). Difraktaik asit için belirlenen IC_{50} değerinin alt ve üst dozlarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 19'de verilmiştir.

Tablo 19. Difraktaik asidin HeLa hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} (µg/mL) değerleri

	HeLa IC_{50} (µg/mL) değerleri	
Liken Asidi	**24. saat**	**48. saat**
Difraktaik Asit	72.26±2.72	22.52±2.24

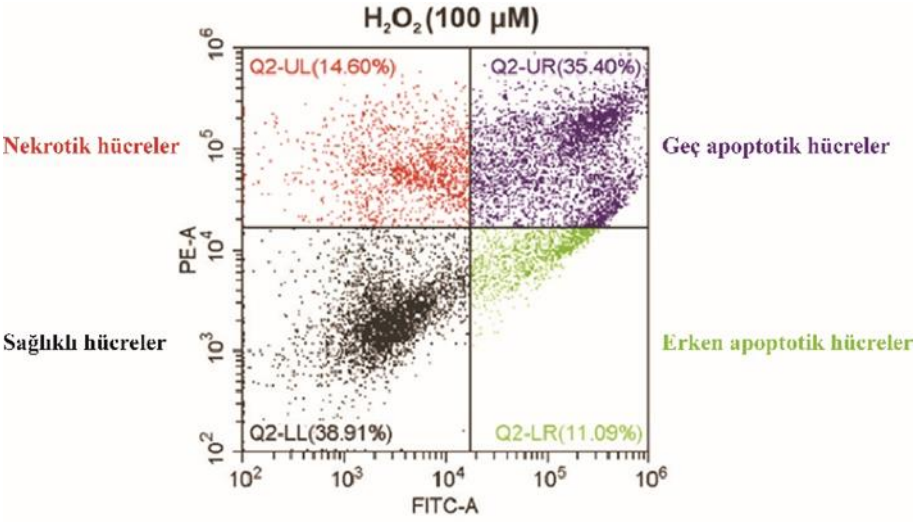


Şekil 19. Difraktaik asidin, HeLa hücre hattında 48 saatlik mumele sonucunda canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi. Ölçek: 100 µm.

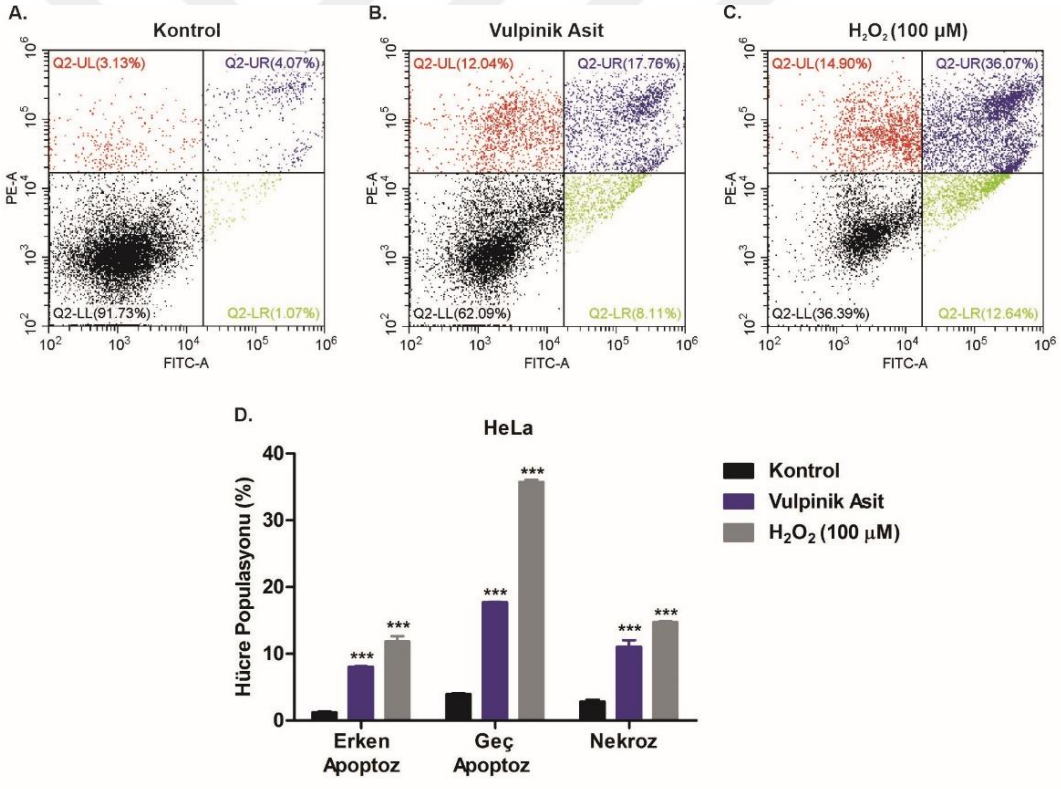
Sonuç olarak, vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin HeLa hücre hattı üzerindeki en etkin IC_{50} değerleri 48 saatlik inkübasyon sonrası belirlenmiş ve bu değerler çalışmanın sonraki deneysel süreçlerinde kullanılmıştır.

4.2. Flow (Akım) Sitometri ile Apoptoz Analizi Sonuçları

Bu tez çalışmasında test edilen vulpinik asit, evernik asit ve difraktaik liken asitlerinin HeLa hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkilerinin apaptoza bağlı olup olmadığını belirlemek amacıyla, XTT sonuçlarına göre belirlenen en etkin IC_{50} konsantrasyonlarında ve süresinde apoptoz testi Annexin V FITC/PI yöntemi kullanılarak yapıldı (Şekil 19) Hücreler FITC-konjuge Annexin V ve PI ile boyandı. Böylece canlı hücreler, erken apoptotik ve geç apoptotik/nekrotik hücrelerin dağılımı flow sitometri ile analiz edildi. Pozitif kontrol olarak hücrelerin 100 µM hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edildiği grup kullanıldı.

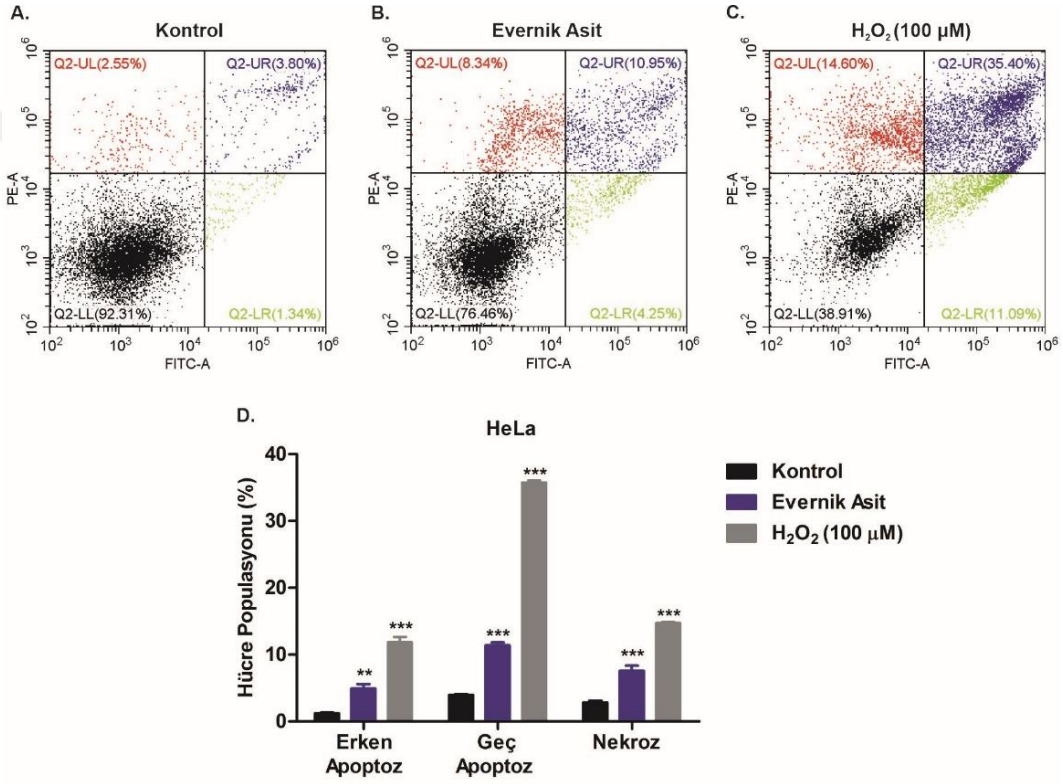


Şekil 20. Annexin V FITC/PI yöntemi ile apoptotik hücrelerin analizi (örnek)



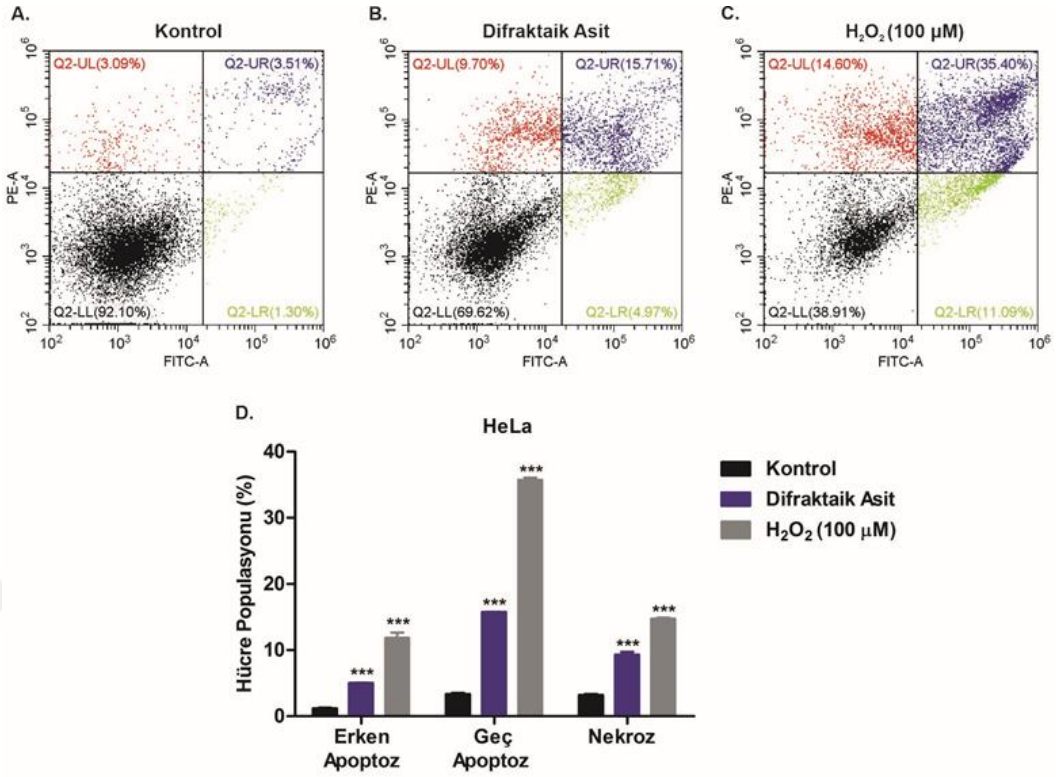
Şekil 21. Vulpinik Asidin HeLa Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Flow Sitometri ile Analizi

Vulpinik asit için XTT testi ile belirlenen en etkin inkübasyon zamanında (48 saat) ve IC_{50} dozunda (66.53±4.03 µg/mL) HeLa hücrelerine uygulanması sonrasında flow sitometri kullanılarak apoptotik etkisi değerlendirildi. Vulpinik asitle muamele edilen HeLa hücre hattında erken apoptoz oranı %1.07'den %8.11'e, geç apoptoz oranı %4.07'den %17.76'ya ve toplam apoptoz oranı da %5.14'den %25.87'ye çıkmıştır. Vulpinik asit ile muamele edilen HeLa hücre hattında erken apoptoz ($p<0.001$), geç apoptoz ($p<0.001$) ve nekrotik ($p<0.001$) hücrelerin oranını kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 22. Evernik Asidin HeLa Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Flow Sitometri ile Analizi

Evernik asit için XTT testi ile belirlenen en etkin inkübasyon zamanında (48 saat) ve IC_{50} dozunda (70.26±1.49 µg/mL) HeLa hücrelerine uygulanması sonrasında flow sitometri kullanılarak apoptotik etkisi değerlendirildi. Evernik asitle muamele edilen HeLa hücre hattında erken apoptoz oranı %1.34'den %4.25'e, geç apoptoz oranı %3.80'den %10.95'e ve toplam apoptoz oranı da %5.14'den %15.2'ye çıkmıştır. Evernik asit ile muamele edilen HeLa hücre hattında erken apoptoz ($p<0.01$), geç apoptoz ($p<0.001$) ve nekrotik ($p<0.001$) hücrelerin oranının kontrol grubuna kıyasla önemli derecece arttığı gözlenmiştir (Şekil 22).



Şekil 23. Difraktaik asidin HeLa hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin flow sitometri ile analizi

Difraktaik asit için XTT testi ile belirlenen en etkin inkübasyon zamanında (48 saat) ve IC_{50} dozunda (22.52±2.24 µg/mL) HeLa hücrelerine uygulanması sonrasında flow sitometri kullanılarak apoptotik etkisi değerlendirildi. Difraktaik asitle muamele edilen HeLa hücre hattında erken apoptoz oranı %1.30'dan %4.97'ye, geç apoptoz oranı %3.51'den %15.71'e ve toplam apoptoz oranı da %4.81'den %20.68'e çıkmıştır. Difraktaik asit ile muamele edilen HeLa hücre hattında erken apoptoz ($p<0.001$), geç apoptoz ($p<0.001$) ve nekrotik ($p<0.001$) hücrelerin oranının kontrol grubuna kıyasla önemli derecece arttığı gözlenmiştir (Şekil 23).

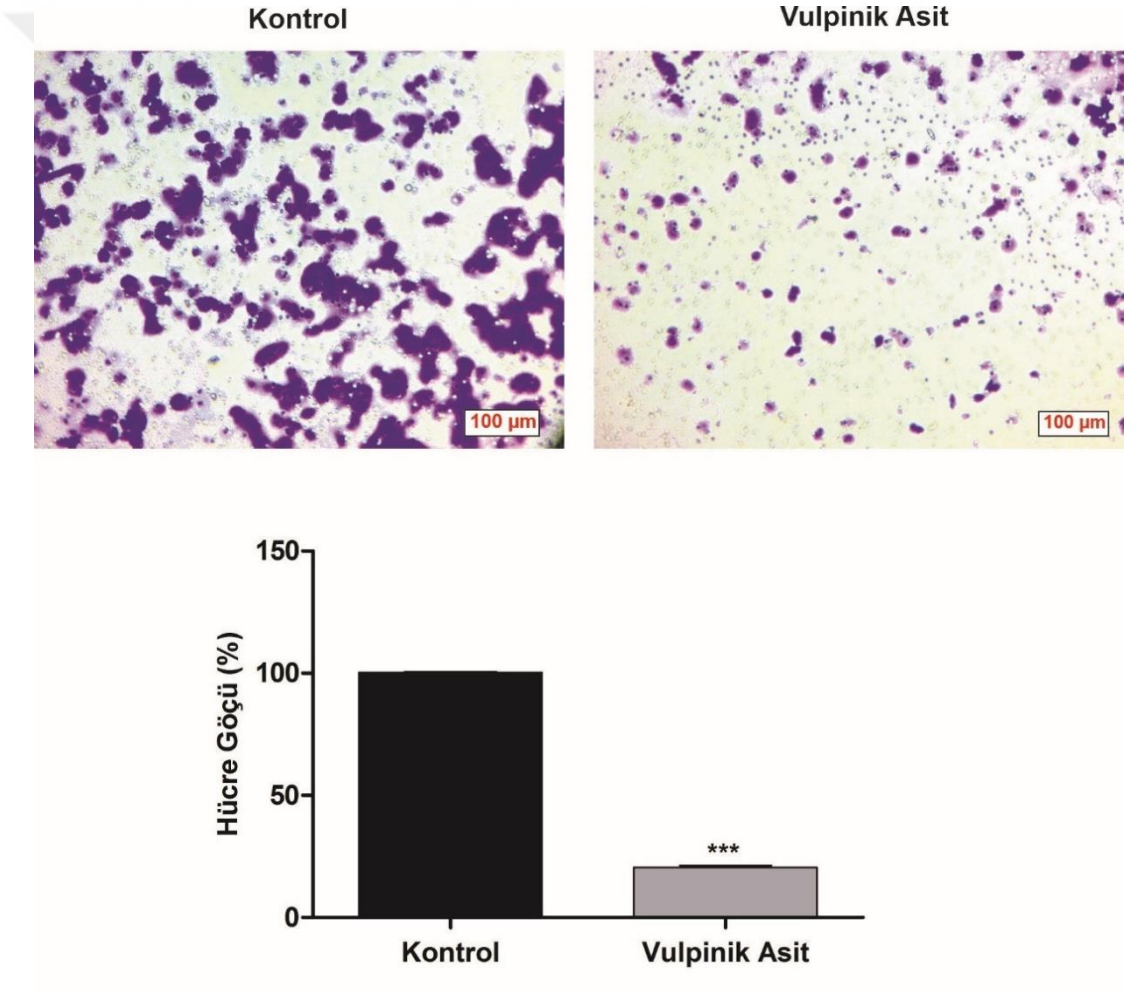
Tablo 20. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin HeLa hücre hattı üzerindeki erken, geç ve toplam apoptotik (%) ve nekrotik (%) değerleri

Gruplar	Erken apoptoz (%)	Geç apoptoz (%)	Toplam Apoptoz (%)	Nekroz (%)
Kontrol	1.2 ± 0.2	3.9 ± 0.2	5.14	2.8 ± 0.4
Vulpinik Asit	8.1 ± 0.1	17.7 ± 0.1	25.87	11.1 ± 1.4
H_2O_2 (100 µM)	11.9 ± 1.1	35.7 ± 0.5	48.71	14.8 ± 0.2
Kontrol	1.2 ± 0.2	3.9 ± 0.2	5.14	2.8 ± 0.4
Evernik Asit	4.9 ± 0.9	11.4 ± 0.6	15.2	7.6 ± 1.1
H_2O_2(100 µM)	11.9 ± 1.1	35.7 ± 0.5	46.49	14.8 ± 0.2
Kontrol	1.2 ± 0.2	3.4 ± 0.2	4.81	3.2 ± 0.2
Difraktaik Asit	5.0 ± 0.05	15.7 ± 0.05	20.68	9.3 ± 0.6
H_2O_2(100 µM)	11.9 ± 1.1	35.7 ± 0.5	46.49	14.8 ± 0.2

4.3. Migrasyon Analizi Sonuçları

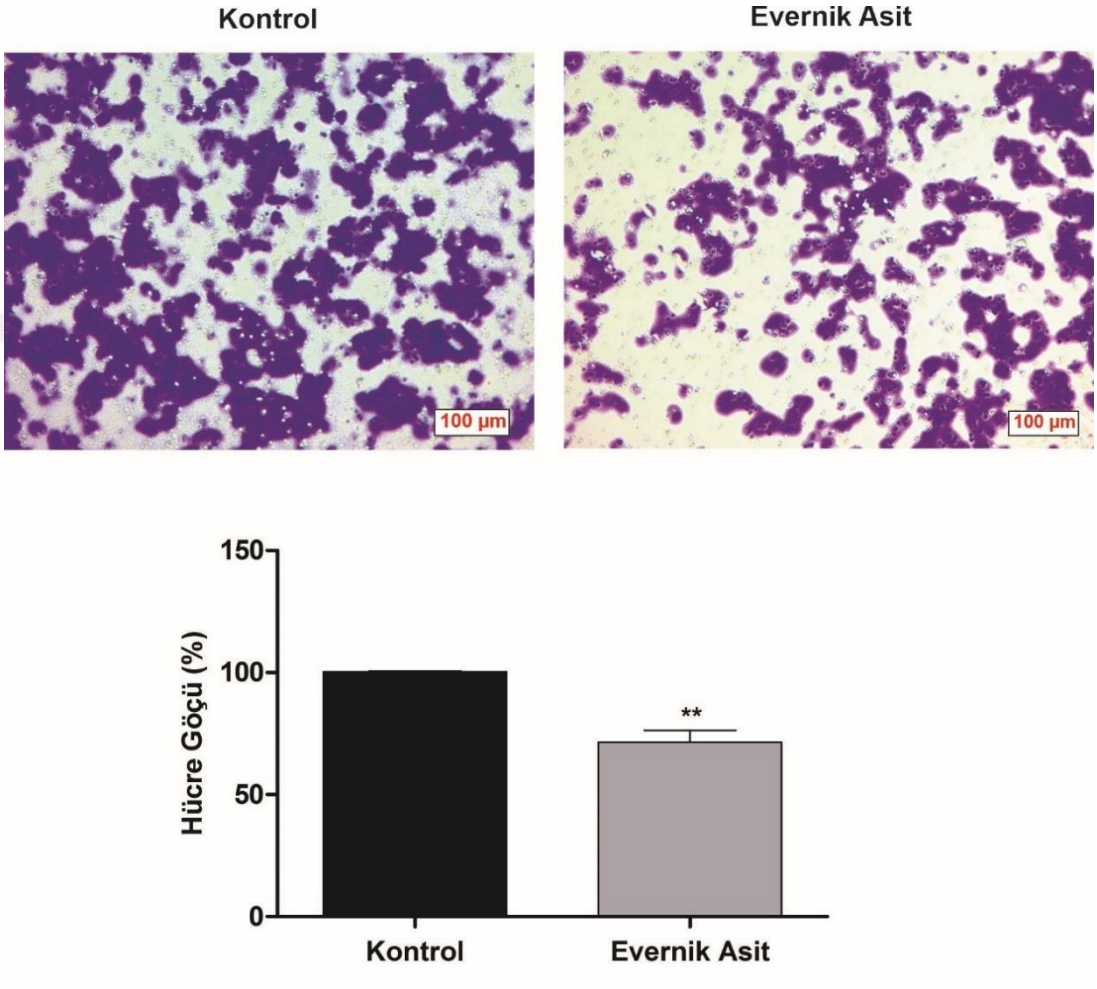
İnsan servikal (HeLa) kanser hücre hattı vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitleri ile muamele edildikten sonra en etkin IC_{50} değerleri belirlenmişti. ThinCert™ hücre kültürü insert sistemi kullanılarak Transwell migrasyon analizi yapıldı ve belirtilen liken asitlerinin HeLa hücre hattında hücre göçü üzerine etkileri belirlendi.

Vulpinik asidin, HeLa hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda hücre göçü üzerindeki etkisi, transwell migrasyon analizi ile değerlendirildi ve vulpinik asidin kontrol grubuna kıyasla hücre göçünü istatistiksel olarak önemli derecede azalttığı gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 24).



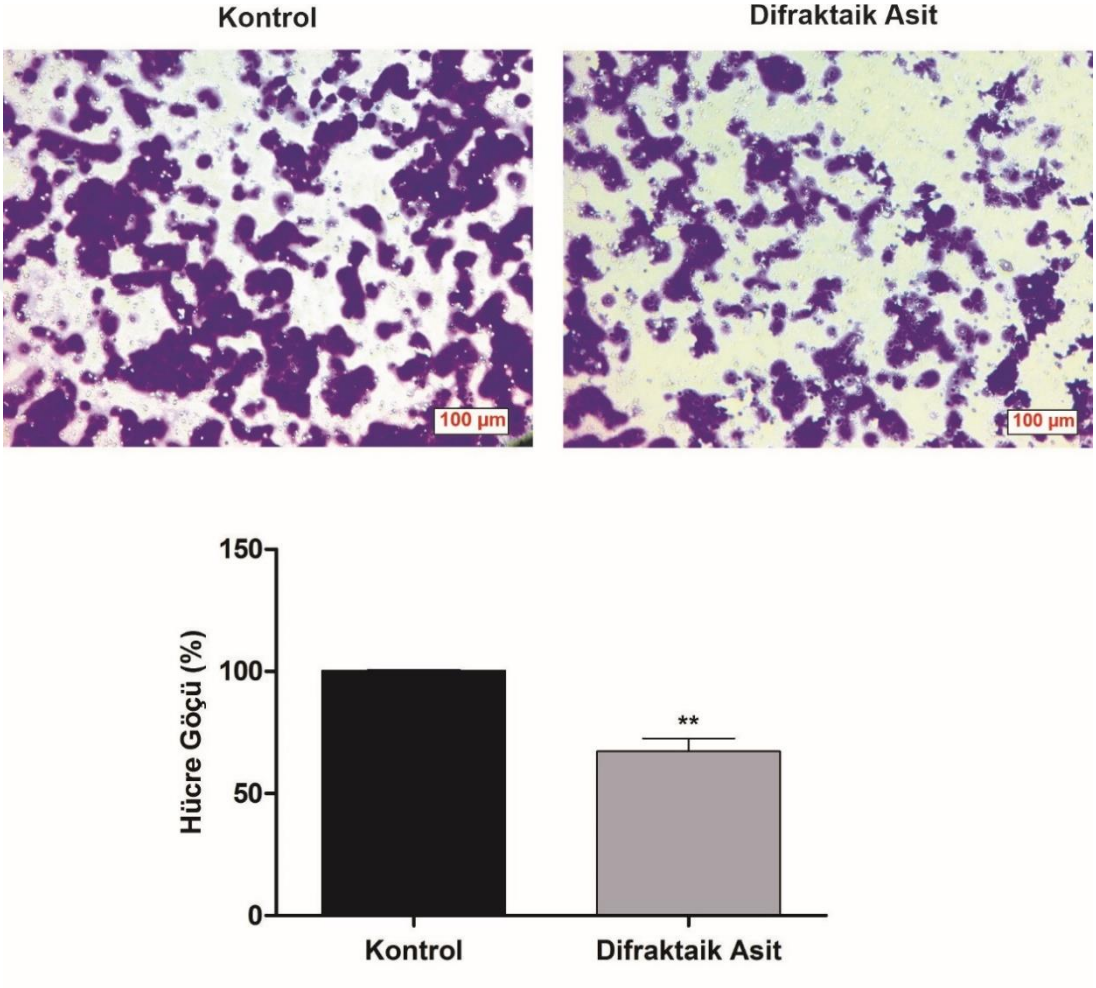
Şekil 24. HeLa kanser hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda vulpinik asit uygulanması sonucu transwell migrasyon analizi

Evernik asidin, HeLa hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda hücre göçü üzerindeki etkisi, transwell migrasyon analizi ile değerlendirildi ve evernik asit kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre göçünü önemli derecede azalttığı gözlemlendi ($p<0.01$) (Şekil 25).



Şekil 25. HeLa kanser hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda evernik asit uygulanması sonucu transwell migrasyon analizi

Difraktaik asidin, HeLa hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda hücre göçü üzerindeki etkisi, transwell migrasyon analizi ile değerlendirildi ve difraktaik asidin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre göçünde isttistiksel olarak önemli bir azalış gözlemlendi ($p<0.01$) (Şekil 26).



Şekil 26. HeLa kanser hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda difraktaik asit uygulanması sonucu transwell migrasyon analizi

Sonuç olarak, HeLa hücre hattı üzerinde üç lilen asidinin de hücre göçünü azalttığı, vulpinik asidin, difraktaik ve evernik liken asitlerine kıyasla hücre göçünü daha fazla baskıladığı gözlenmiştir.

4.4. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları

4.4.1. mRNA Saflık ve Konsantrasyon Sonuçları

İnsan servikal (HeLa) kanser hücre hattı üzerine vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitleri için daha önce belirlenen en etkin IC_{50} konsantrasyonu ve uygulama süresince uygulanarak muamele grubu oluşturuldu. Kontrol grubu olarak ise liken asitleri yerine besiyeri eklenmiş HeLa hücre hattı kullanıldı. Kontrol ve muamele grubu HeLa hücrelerinden total RNA, "*3.9.1. Total RNA İzolasyonu*" kısmında verilen protokole göre saflaştırıldı ve izole edilen total RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonları her bir örnek için nanodrop cihazı yardımı ile spektrofotometrik olarak belirlendi (Tablo 21). RNA örnekleri için ölçülen A260/A280 oranının yaklaşık olarak 2.0 olması yapılan saflaştırma işleminin etkinliğini ve saflığını göstermektedir.

Tablo 21. Liken asitlerinin HeLa hücre hattı için belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarında uygulaması ile elde edilen total RNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri

Gruplar	260/280	ng/µL
Kontrol 1	2.17	690.60
Kontrol 2	2.17	771.96
Kontrol 3	2.16	631.40
Vulpinik Asit 1	2.17	151.16
Vulpinik Asit 2	2.14	133.24
Vulpinik Asit 3	2.14	140.28
Evernik Asit 1	2.18	183.64
Evernik Asit 2	2.18	170.84
Evernik Asit 3	2.17	165.80
Difraktaik Asit 1	2,15	247.88
Difraktaik Asit 2	2,16	275.80
Difraktaik Asit 3	2.03	284.20

4.4.2. cDNA Saflık ve Konsantrasyon Sonuçları

Kontrol ve muamele gruplarından izole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit sistemi kullanıldı ve üretici firmanın protokolüne göre cDNA sentezi, *"3.9.3. Total RNA Örneklerinden cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması"* kısmında verilen protokole göre gerçekleştirildi. cDNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonları her bir örnek için nanodrop cihazı yardımı ile spektrofotometrik olarak

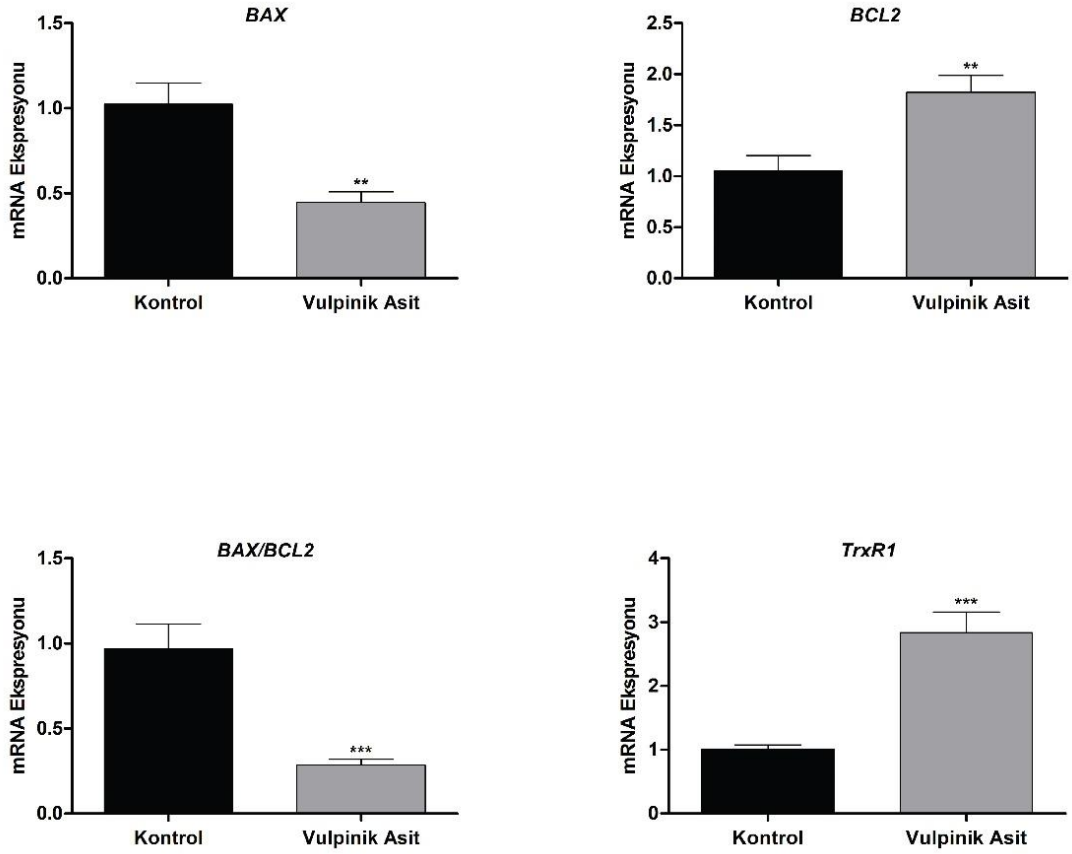
belirlendi. Elde edilen cDNA örnekleri içi ölçülen A260/A280 oranının yaklaşık olarak 1.8 olması yapılan saflaştırma işleminin etkinliğini ve saflığını göstermektedir (Tablo 22).

Tablo 22. HeLa Hücre Hattı İçin Belirlenen IC_{50} Konsantrasyonunda Liken Asitlerinin Uygulaması ile Elde Edilen cDNA'ların Saflık ve Konsantrasyon Değerleri

Gruplar	260/280	ng/µL
Kontrol 1	1.94	1521.90
Kontrol 2	1.84	2878.80
Kontrol 3	1.82	2845.00
Vulpinik Asit 1	1.84	2886.90
Vulpinik Asit 2	1.83	2895.80
Vulpinik Asit 3	1.84	2836,30
Evernik Asit 1	1.87	2706.70
Evernik Asit 2	1.86	2767.80
Evernik Asit 3	1,89	2560.00
Difraktaik Asit 1	1.90	2528.50
Difraktaik Asit 2	1.90	2444.50
Difraktaik Asit 3	1.91	2360.80

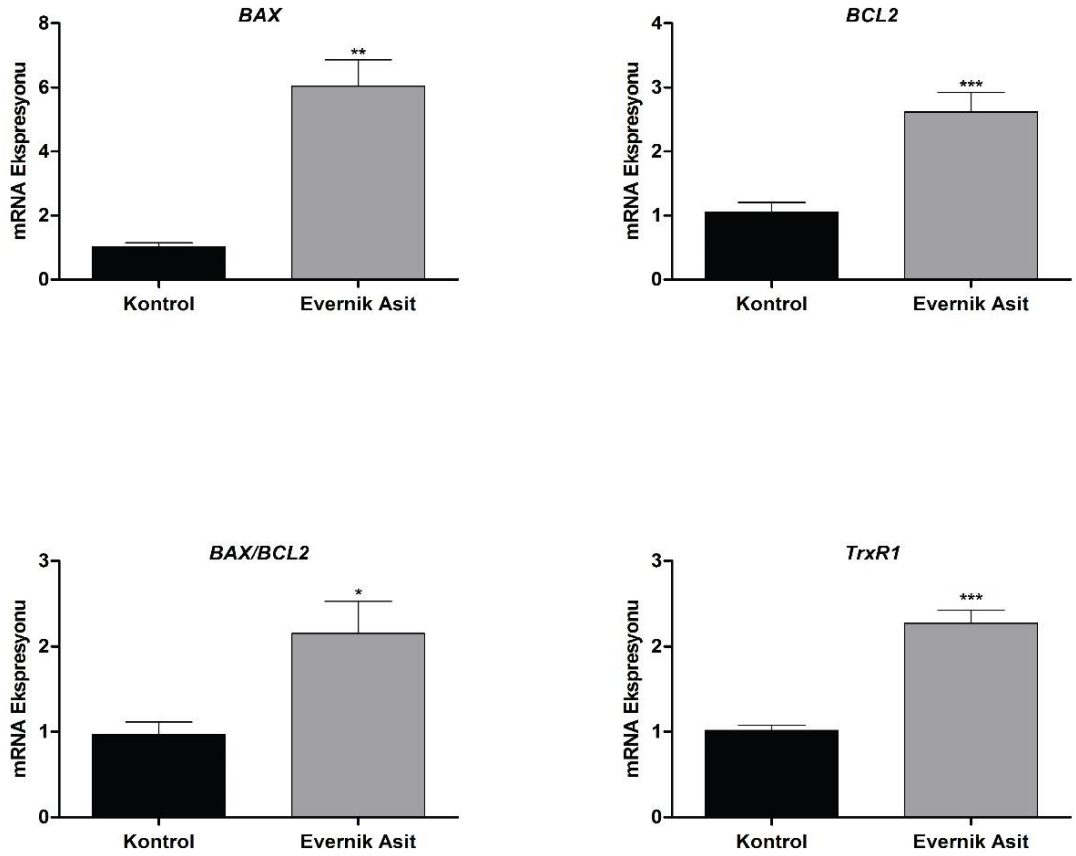
4.4.3. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Analizi Sonuçları

İnsan servikal (HeLa) kanser hücre hattında vulpinik, evernik ve difraktaik asidin için daha önce belirlenen etkin IC_{50} dozlarında uygulanması sonrasında hazırlanan cDNA'lar kullanılarak, apoptotik yolak genlerinden Bax ve Bcl-2 için ve ayrıca çeşitli kanser hücrelerinde özelliklede HeLa kanser hücre hattında aşırı ekspresyonu sebebiyle antikanser tedavisi için belirteç olarak da kabul edilen TrxR1 için kantitatif gen ekspresyon değişimine SYBR Green yöntemi kullanılarak Real-Time PCR ile bakıldı.



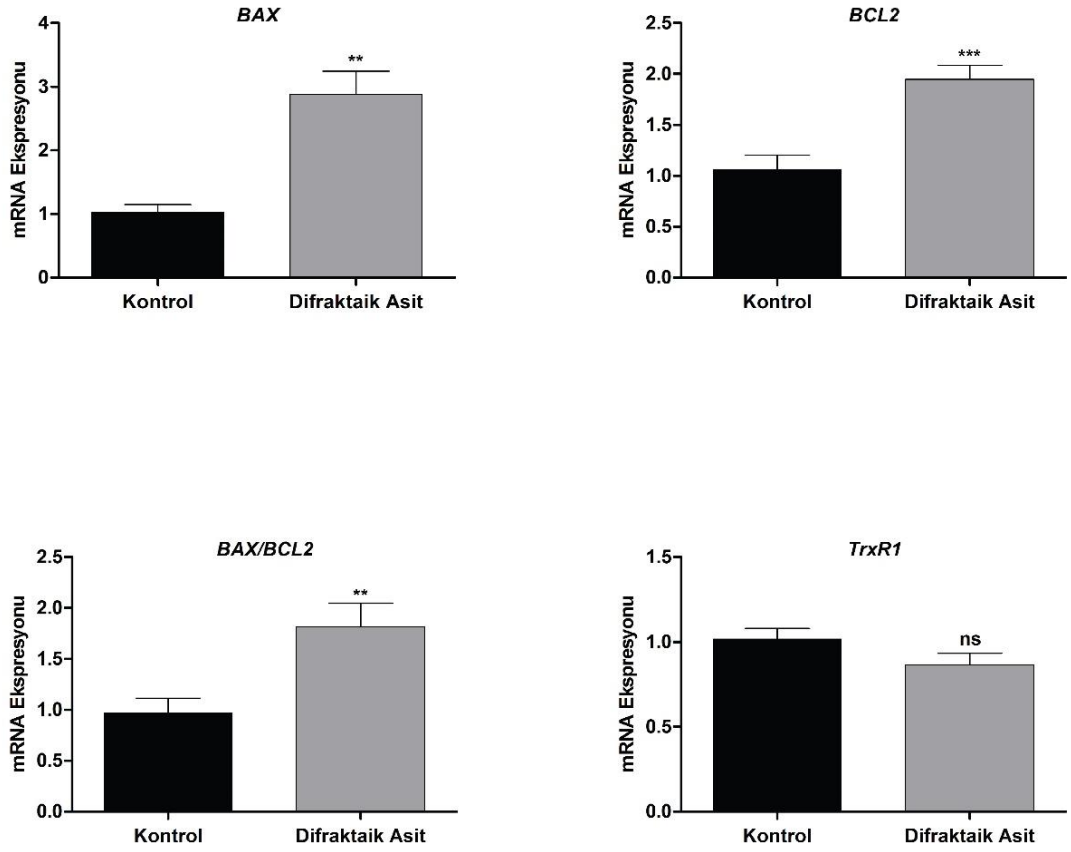
Şekil 27. Vulpinik asidin, HeLa hücre hattında Bax, Bcl-2 ve TrxR1 genlerinin kantitatif ekspresyon profillerine ve Bax/Bcl-2 oranına etkisinin Real-Time PCR ile belirlenmesi

HeLa hücre hattında vulpinik asit için belirlene belirlenen IC50 dozunun uygulanması sonucu apoptotik yolak genlerinden Bax'ın ekspresyonunun önemli derecede azaldığı (**, $p<0.01$) ve Bcl-2'nin önemli derecede arttığı (**, $p<0.01$) gözlendi. Burada asıl önemli olan ve artışının apoptozun indüklendiğinin göstergesi olan Bax/Bcl-2 oranının önemli derecede azalması (***, $p<0.001$) vulpinik asidin antiproliferatif etkisinin apoptoz üzerinden olmadığını göstermektedir. Ayrıca, vulpinik asidin, HeLa hücre hattı üzerinde TrxR1'in gen ekspresyonunu istatistiki olarak yüksek derecede önemli olarak artırttığı (***$p<0.001$) gözlendi (Şekil 27).



Şekil 28. Evernik asidin, HeLa hücre hattında Bax, Bcl-2 ve TrxR1 genlerinin kantitatif ekspresyon profillerine ve Bax/Bcl-2 oranına etkisinin Real-Time PCR ile belirlenmesi

HeLa hücre hattında evernik asit için belirlene belirlenen IC_{50} dozunun uygulanması sonucu apoptotik yolak genlerinden Bax (***p<0.001) ve Bcl-2 (***p<0.001) ekspresyonlarını istatistiki olarak yüksek derecede önemli olarak artırttığı gözlendi. Burada asıl önemli olan ve artışının apoptozun indüklendiğinin göstergesi olan Bax/Bcl-2 oranının önemli derecede artması (*p<0.05) evernik asidin antiproliferatif etkisinin apoptoz üzerinden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, evernik asidin, HeLa hücre hattı üzerinde TrxR1'in gen ekspresyon miktarını istatistiki olarak yüksek derecede önemli olarak artırttığı (***p<0.001) gözlendi (Şekil 28).



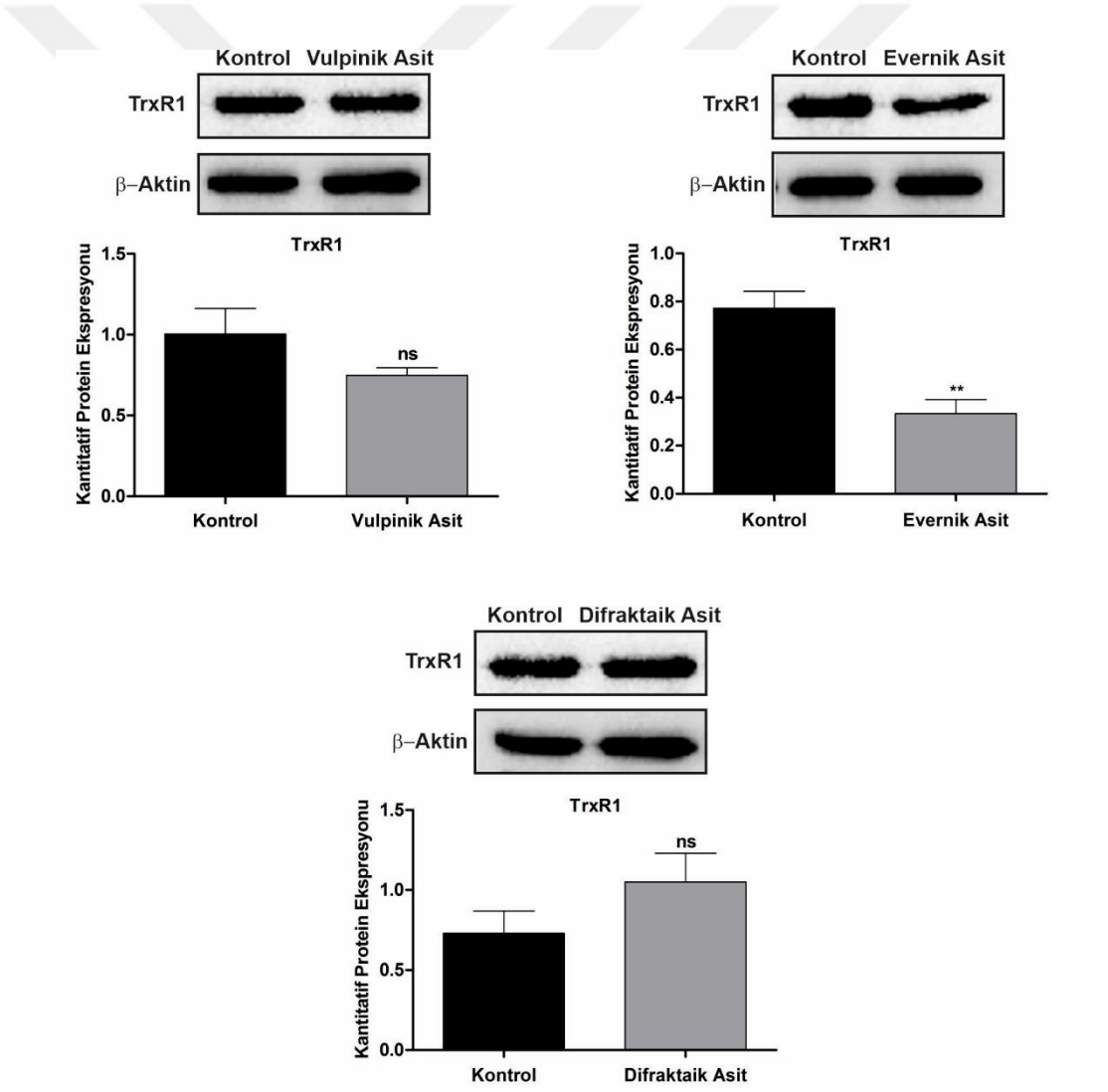
Şekil 29. Difraktaik asidin, HeLa hücre hattında Bax, Bcl-2 ve TrxR1 genlerinin kantitatif ekspresyon profillerine ve Bax/Bcl-2 oranına etkisinin Real-Time PCR ile belirlenmesi.

HeLa hücre hattında difraktaik asit için belirlene belirlenen IC_{50} dozunun uygulanması sonucu apoptotik yolak genlerinden Bax (**p<0.01) ve Bcl-2 (***p<0.001) ekspresyonlarının önemli derecede artırttığı gözlendi. Burada asıl önemli olan ve artışının apoptozun indüklendiğinin göstergesi olan Bax/Bcl-2 oranının istatistiki çok önemli derecede artması (**p<0.01) difraktaik asidin antiproliferatif etkisinin apoptoz üzerinden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, difraktaik asidin, HeLa hücre hattı üzerinde TrxR1'in gen ekspresyon miktarınında istatistiki anlamlı farklılık (p>0.05=ns) gözlenmedi (Şekil 29).

4.5. Kantitatif Protein Ekspresyon Analiz (Western Blot) Sonuçları

Evernik, vulpinik ve difraktaik liken asitleri için belirlenen en etkin IC_{50} konsantrasyonunda ve uygulama süresinde HeLa kanser hücre hattı ile muamele edildikten sonra total protein izole edildi. 40 µg lizat SDS PAGE jeline yüklenerek western blot yapıldı. Liken asitleriyle muamele edilen HeLa hücresindeki TrxR1 proteininin ekspresyonundaki kantitatif değişiklik western blot yöntemiyle araştırıldı.

Şekil 30'da görüldüğü üzere evernik asit ile muamele edilen HeLa hücre hattında TrxR1 proteininin ekspresyonunda önemli derecede azalma görüldü ($p<0.001$). Fakat hem vulpinik hem de difraktaik asit ile muamele sonrasında TrxR1 protein ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0.05$).

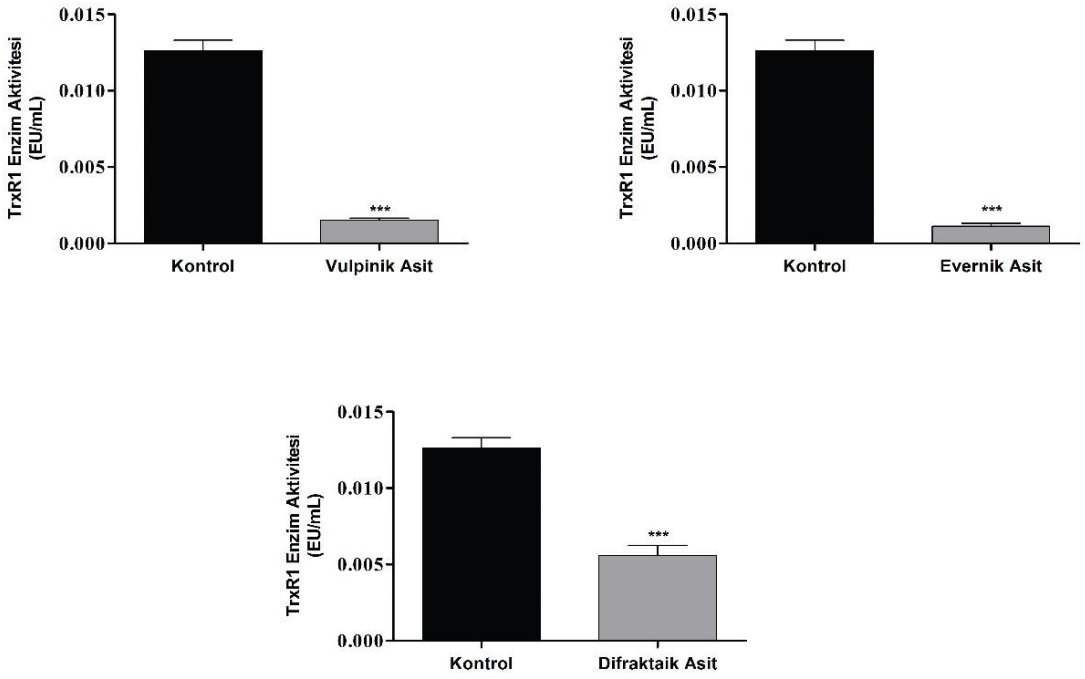


Şekil 30. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin HeLa kanser hücre hattı ile muamele edildikten sonra TrxR1'in kantitatif protein ekspresyonu üzerine etkisinin western blot yöntemiyle gösterilmesi.

4.6. Tiyoredoksin Redüktaz 1 (TrxR1) Enzim Aktivitesi Sonuçları

İnsan servikal (HeLa) kanser hücre hattında vulpinik, evernik ve difraktaik asidin için daha önce belirlenen etkin IC_{50} dozlarında uygulanması sonrasında hazırlanan homojenatlarda TrxR1 enzim aktivitesine DTNB yöntemi ile bakıldı. Birçok kanser hücresinde özelliklede HeLa kanser hücre hattında yüksek aktivite gösteren TrxR1'i inhibe eden yeni inhibitörlerin tanımlanması yeni kemoterapötik stratejilerin geliştirilmesi için önemlidir.

Bu tez çalışmasında, vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitleriyle IC_{50} dozlarında muamele edilmiş HeLa hücrelerinde (muamele grubu) ve kontrol grubu HeLa hücrelerinde TrxR1 aktivitesine bakıldı. Üç liken asidi TrxR1 aktivitesini yüksek derecede önemli olarak inhibe ettiği (***p<0.001) gözlemlendi (Şekil 30).



Şekil 31. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin HeLa hücre hattında TrxR1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.

5. TARTIŞMA

Kanser, basit bir şekilde kontrolsüz hücre bölünmesi ve anormal hücre büyümesi olarak tanımlanmaktadır. Kanserler, ortaya çıktığı organa göre isimlendirilir ve her bir kanser türü farklı transkriptomik ve proteomik içeriğe sahiptir. Bu sebeple kanser türlerinin büyüme hızları, yayılma hızları ve tedavilere cevap verme şekilleri birbirlerine göre farklılıklar gösterir. İskemik kalp hastalıklarından sonra dünyada ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer alan kanserin önümüzdeki kırk yıl içerisinde ölüme neden olan hastalıklar arasında ilk sıraya gelmesi beklenmektedir (1,45). Kanser vakalarının yüksek ölüm oranlarına sahip olması kanserle mücadelenin özel bir ilgi alanı olmasına, teşhisi, tedavisi, önlenmesi ve koruyucu müdahalelerin geliştirilmesi ile alakalı çok sayıda çalışma yapılmasına sebep olmuştur. Bunun sonucu olarak birçok kanser için kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi, bazı kanserler için tarama, önleme ve erken teşhis metotlarının geliştirilmesi kanserden ölüm riskini 2015'ten 2019'a kadar yılda yaklaşık %2 oranında düşürmüştür. Kanser ölüm oranındaki artan düşüş eğilimi, önleme, tarama, erken teşhis, tedavinin gücünü ve kanserin olmadığı bir dünyaya yaklaşma konusundaki genel potansiyeli göstermektedir (295,296).

Kadınlarda en sık görülen ve her yıl yaklaşık 2,1 milyon kadını etkileyen meme kanserini kolorektal, akciğer ve serviks kanserleri izlemektedir. Serviks kanseri kadınlarda, sık görülen kanser türleri arasında ve kansere bağlı ölümler arasında dünyada dördüncü sırada yer almaktadır. Serviks kanseri insidans ve ölüm oranları birçok etkene bağlı olarak bölgesel değişkenlik göstermektedir (2). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre serviks kanseri dünya genelinde jinekolojik kanserler arasında en sık görülen kanseri oluştururken; gelişmiş ülkelerde endometrium ve over kanserinden sonra üçüncü sıklıkta görülen jinekolojik kanserdir. Bu durum, serviks kanserinin, gelişmekte olan ülkelerde daha önemli bir sorun oluşturduğunu ortaya koymaktadır (97).

Serviks kanserinin tedavisi, kanserin türü, evresi, olası yan etkileri, kadının yaşı, tercihleri, fertilite isteği ve genel sağlık gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) ve Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) tarafından tanı anındaki hastalık evresine göre standart tedavi yaklaşımları olarak cerrahi, radyasyon ve kemoterapi veya bunların değişik kombinasyonları önerilmiştir (23,142). Kemoterapi tedavisinde, kullanılan antikanser ilaçların yan etkilerinin görülmesi ve ilaçlara direnç gelişmesi en büyük dezavantajlarıdır (297). Bu sebeple kanser türüne spesifik, yan etkisi az, güvenilir, etkinliği yüksek yeni antikanser ajanlarının belirlenmesi önem kazanmıştır (237)(256,298).

Hâlihazırda kullanılan antikanser ilaçların büyük bir çoğunluğu bitki, mantar, bakteri gibi kolayca temin edilebilen ve nispeten güvenilir doğal kaynaklardır (299). Dünyada pek çok doğal kaynağın bulunması yeni antikanser ajanların keşfedilmesi için büyük bir fırsattır. Son yıllarda bir mikrobiyant ve bir fotobiyontun simbiyotik birlikteliği olan ve dış ortamlara dayanıklı likenlerin sentezlemiş oldukları sekonder metabolitlerin, antikanser ajan olarak kullanılabilirliğini inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır (38,297). Çeşitli liken türlerinden ve kültürlü simbiyontlarından 1000'den fazla sekonder metabolit tanımlanmış olması yeni antikanser ajanların keşfi için önemli bir kaynaktır (297,300). Liken metabolitleri; antiviral, antiinflamatuar, antifungal ve enzim inhibitörü gibi birçok biyolojik özelliğe sahip olması ilaç endüstrisinde veya tarımda potansiyel bir kimyasal kaynak olabileceğini düşündürmektedir (35,38,245).

Hong ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, antiproliferatif, antiinflamatuar ve antioksidan aktiviteleri bilinen ve liken türevi metabolitlerden olan lobarik asit ve lobarstinin insan serviks kanser hücre hattı (HeLa) üzerine antikanser etkinliği araştırılmıştır. Lobarik asit ve lobarstinin HeLa hücrelerinde hücre döngüsünü durdurarak ve mitokondriyal apoptotik yol aracılığıyla apoptoz indüksiyonu sağlayıp hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe edebildiği gösterilmiştir. Böylece bu iki liken metabolitinin serviks kanser tedavisinde yeni kemoterapötik ajanlar olabileceği öne sürülmüştür (256).

Yapılan başka bir çalışmada, radyocerrahi tedavisinden sonra insan papilloma virüs (HPV) genital enfeksiyonunun adjuvan tedavisi olarak bir çinko sülfat ve liken türevi olan usnik asit bileşiğinin intravajinal uygulamasının reepitelizasyon hızını arttırdığı ve rekürrensi azalttığı gösterilmiştir (254).

Brisdelli ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada, altı liken metabolitinin (difraktaik asit, lobarik asit, usnik asit, vicanisin, variolarik asit, protolichesterinik asit) serviks (HeLa) kanser hücre hattı üzerine proliferasyon, canlılık ve reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyine etkileri araştırılmıştır. Variolarik asidin HeLa hücre hattının canlılığını etkilemediği, vicanisin ile muamelede HeLa hücrelerinde doza bağlı bir şekilde önemli bir canlılık kaybına neden olduğu, difraktaik ve lobarik asit ile muamelede ise HeLa hücrelerinin canlılığındaki azalma daha yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiştir. Usnik ve protolikesterinik asitlerin en yüksek sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Protolikesterinik asit ile muamele edilen HeLa hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu, apoptotik yolun aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (39).

Yine Brisdelli ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada doksorubisinin HeLa hücre hattına karşı *in vitro* antiproliferatif etkisinin, protolichesterinik asit tarafından sinerjik olarak arttırıldığı, HeLa hücrelerinde protolichesterinik asidin neden olduğu artan sitotoksisitenin kaspas aktivasyonuna neden olarak apoptozu indüklemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve protolichesterinik asidin antikanser ilaçlarla kombinasyon tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (257).

Yuan Shao ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada, bir tiyoredoksin redüktaz (TrxR) inhibitörü olan sentetik kurkumin analogu B5'in, serviks kanser hücrelerinde tiyoredoksin sistemi baskılayarak mitokondriye bağlı apoptoz yolağı ve otofajiyi tetiklediği gösterilmiştir (225).

Memelilerde tiyoredoksin sistemi, hücresel redoks kontrol mekanizması dışında apoptoz, hücrelerin gelişimi, farklılaşması ve çoğalması, DNA sentezi, DNA onarımı, transkripsiyon, anjiyogenezin düzenlenmesi gibi çeşitli hücresel olaylarda da rol oynamaktadır (210,220,221). Tiyoredoksin sistem, tümör hücresinin proliferasyonunu teşvik etmek için artan aktivitesi ile birlikte anjiyogenez, invazyon ve metastazın indüklenmesinde de görev almaktadır. Bu yüzden tümör biyolojisinde özel bir öneme sahiptir (210,290). Ayrıca, tiyoredoksin sistem, antioksidan aktivitesi ile oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne karşı tümör hücresi direncine katkıda bulunur (3). Bu yüzden son zamanlarda yapılan çalışmalarda, meme, akciğer, karaciğer, mide ve serviks kanserlerinde TrxR'nin aşırı eksprese olduğu ve ilaç direnci ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (16–19,29,222). Bu sebeple TrxR'nin kanser çalışmaları için seçici bir markır olarak kullanılmaya başlanmış ve TrxR inhibisyonu kemoterapötik ajan araştırmaları için bir hedef kabul edilmiştir (15,17,213).

Bu çalışmada, evernik, vulpinik ve difraktaik liken asitlerinin insan servikal kanser hücre hattı (HeLa) üzerinde antikanser etkisine bakıldı ve belirlenen antikanser etkinin tiyoredoksin redüktaz 1 (TrxR1) üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği gen ve protein seviyesinde araştırıldı.

İnsan meme kanser hücreleri (MCF-7, MDA-MB231, BT474, SK-BR3) ve meme epitel hücresi (MCF-12A) üzerinde yapılan bir çalışmada vulpinik asidin hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği ve p53 ekspresyonunu arttırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (260).

Kolorektal karsinom (CaCo2), hepatosellüler karsinom (HepG2), servikal kanser (Hep2C), rabdomyosarkom (RD) ve fibrosarkom (Wehi) gibi farklı kanser hücre hatları ile

vulpinik asidin doz ve zaman (24, 48 ve 72 saat) bağımlı olarak muamele edildiğinde, hücre canlılığını 48 saatte inhibe ettiği ve Bax/Bcl-2 oranını ve p53 gen ekspresyon seviyesini artırarak apoptozu indüklediği belirtilmiştir (261). Ayrıca, vulpinik asidin metastatik prostat kanser hücrelerinin (PC-3) canlılığını azalttığı gösterilmiştir (258).

Günaydın tarafından 2021 yılında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında vulpinik asidin insan akciğer (A549) kanser hücre hattı üzerinde 48 saatte 36.21 µg/mL IC_{50} konsantrasyonunda sitotoksik etki gösterdiği ve yara iyileştirme analizi ile migrasyonu yüksek derecede engellediği belirtilmiştir. Ayrıca vulpinik asidin A549 hücrelerinin, hem flow sitometrik olarak analiziyle hem de Bax/Bcl-2 oranını ve p53 gen ekspresyon seviyesini artırması ile apoptozu indüklediği ve TrxR1'in kantitatif gen ve protein ekspresyonlarında değişikliğe sebep olmadan TrxR1 enzim aktivitesini önemli derecede baskıladığı gösterilmiştir (301).

Karaca tarafından 2021 yılında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında vulpinik asidin insan karaciğer kanser hücre hattında (HepG2) antiproliferatif etki gösterdiği, migrasyonu yüksek derecede engellediği, Bax/Bcl-2 oranını artırarak apoptozu indüklediği ve TrxR1 enzim aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (285).

Kalın tarafından 2022 yılında yapılan doktora tez çalışmasında vulpinik asidin insan meme kanser hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-453) üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, apoptoz üzerine bir etki yapmadan migrasyonu yüksek derecede engellediği ve TrxR1 enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterildi (286).

Literatürde vulpinik asidin HeLa hücre hattı üzerine antikanser etkisi hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında bu durum ilk kez araştırılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda vulpinik asidin HeLa kanser hücre hattında etkin IC_{50} konsantrasyon değerlerinin sırasıyla 24 saat uygulama süresinde 64.28 µg/mL ve 48 saat uygulama süresinde 66.53 µg/mL olduğu ve etkili bir antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Akım (flow) sitometrik analizi sonuçlarına göre, vulpinik asidin HeLa hücre hattını önemli derecede erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroza yönlendirdiği görülmüştür. Kanser hücre hattının apoptoza yönlendirdiğinin bir göstergesi olan artan Bax/Bcl-2 oranına da Real-Time PCR yöntemiyle bakılmıştır. Sonuçlara göre, vulpinik asit ile muamele edilen HeLa hücre hattında Bax/Bcl-2 oranının önemli derecede azalış gösterdiği saptanmıştır. Bu durum vulpinik asidin apoptozu reseptör aracılı veya endoplazmik retikulum yolları gibi diğer yollar aracılığıyla yapabildiğini işaret ediyor olabilir. Benzer durum Yang ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmada da vurgulamışlardır (302). Ayrıca, transwell migrasyon analiz sonuçları vulpinik asidin HeLa

hücrelerinin metastaz yapmasını önemli derecede engellediğini gösterilmiştir. Buradaki ilginç noktalardan birisi, vulpinik asidin HeLa kanser hücre hattında TrxR1'in kantitatif gen ekspresyonunu arttırmasına ve protein ekspresyonunu değiştirmemesine karşı TrxR1 enzim aktivitesini önemli derecede inhibe etmiş olmasıdır. Bu durum vulpinik asidin asıl etkisini posttranslasyonel seviyede gösterdiğini düşündürmektedir.

Evernik asidin insan prostat kanseri (22RV1), insan kolon kanseri (HT-29), insan hepatoselüler karsinoması (HepG2) ve hamster yumurtalık kanseri (CHO) hücre hatları üzerinde doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği ve hücre canlılığının kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda antioksidan ve antimikrobiyal aktivite sergiledikleri gösterilmiştir (249).

Günaydın tarafından 2021 yılında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında evernik asidin insan akciğer (A549) kanser hücre hattı üzerinde 24 saatte 139.09 µg/mL IC_{50} konsantrasyonunda sitotoksik etki gösterdiği, yara iyileştirme analizi ile migrasyonu yüksek derecede engellediği, Bax/Bcl-2 oranını artırarak apoptozu indüklediği ve TrxR1 gen ve protein ekspresyonunda değişikliğe sebep olmadan enzim aktivitesini önemli derecede baskıladığı gösterilmiştir (301).

Karaca tarafından 2021 yılında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında evernik asidin insan karaciğer kanser hücre hattında (HepG2) antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Evernik asidin HepG2 kanser hücre hattı üzerinde apoptotik etkisinin olmadığı, migrasyonu yüksek derecede engellediği ve TrxR1 gen, protein ve enzimatik seviyede etkilemediği saptanmıştır (285).

Kalın tarafından 2022 yılında yapılan doktora tez çalışmasında evernik asidin insan meme kanser hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-453) üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, apoptoz üzerine bir etki yapmadan migrasyonu yüksek derecede engellediği ve TrxR1 enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterildi(286).

Evernik asidin HeLa hücre hattı üzerine etkisinin çalışıldığı tek çalışma olan ve kongrede sunulan bir bildiride evernik asidin HeLa kanser hücre hattına karşı antitümör aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir (303). Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, HeLa hücre hattıyla evernik asidin 48 saatlik inkübasyonu neticesinde etkin IC_{50} değeri 70.26 µg/mL olduğu ve etkili bir antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Akım (flow) sitometrik analizi sonuçlarına göre, evernik asidin HeLa kanser hücre hattı üzerinde önemli derecede erken ve geç apoptotik ve nekrotik etki sergilediği gösterilmiştir. Kanser hücre hattının

apoptoza yönlendirdiğinin bir göstergesi olan artan Bax/Bcl-2 oranına da Real-Time PCR yöntemiyle bakıldı. Evernik asit ile muamele edilen HeLa hücre hattında Bax/Bcl-2 oranının önemli derecede artış göstermesi akım (flow) sitometrik analizi ile paralellik göstermektedir ve HeLa hücresini apoptoza yönlendirdiğini göstermektedir. Ayrıca, transwell migrasyon analiz sonuçları evernik asidin HeLa hücrelerinin metastaz yapmasını önemli derecede engellediği gösterilmiştir. Buradaki ilginç noktalardan birisi, evernik asidin HeLa kanser hücre hattında TrxR1 gen ekspresyonunu arttırmasına karşı TrxR1 protein ve enzim aktivitesini önemli derecede inhibe etmiş olmasıdır.

Difraktaik asidin glioblastoma multiforme hücre hattı (U87MG), primer sıçan serebral korteks (PRCC) hücreleri ve insan keratinosit hücre hattında (HaCaT) sitotoksik ve antiproliferatif aktivite göstererek hücre büyümesine engel olduğu gösterilmiştir (272,273).

Günaydın tarafından 2021 yılında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında difraktaik asidin insan akciğer (A549) kanser hücre hattı üzerinde 48 saatte 46.37 µg/mL IC_{50} konsantrasyonunda sitotoksik etki gösterdiği ve yara iyileştirme analizi ile migrasyonu engellediği belirtilmiştir. Ayrıca difraktaik asidin A549 hücrelerinin, hem flow sitometrik olarak analiziyle hem de Bax/Bcl-2 oranını ve p53 gen ekspresyon seviyesini artırması ile apoptozu indüklediği ve TrxR1 gen ve protein ekspresyonunda değişikliğe sebep olmadan enzim aktivitesini önemli derecede baskıladığı gösterilmiştir (301).

Karaca tarafından 2021 yılında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında difraktaik asidin insan karaciğer kanser hücre hattında (HepG2) antiproliferatif etki gösterdiği, p53 gen ekspresyon seviyelerini artırarak apoptotik etkisinin olduğu, migrasyonu yüksek derecede engellediği ve TrxR1 enzim aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (285).

Kalın tarafından 2022 yılında yapılan doktora tez çalışmasında difraktaik asidin insan meme kanser hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-453) üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, Bax/Bcl-2 oranını ve p53 gen ekspresyon seviyesini artırarak apoptozu indüklediği, migrasyonu yüksek derecede engellediği ve TrxR1 enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterildi(286).

Brisdelli ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada, difraktaik asidin meme kanseri hücre hattı (MCF-7), servikal hücre hattı (HeLa) ve kolon karsinomu hücre hattında (HCT-116) sitotoksik, antiproliferatif ve proapoptotik özellikleri araştırılmıştır. Difraktaik asit HCT-116 hücrelerine karşı iyi bir antiproliferatif aktivite gösterirken, MCF-7

ve HeLa hücrelerinin canlılığındaki azalma daha yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiştir. (39). Bu çalışma HeLa hücre hattı ile difraktaik asit arasında yapılan tek çalışmadır.

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre, difraktaik asidin HeLa hücre hattı üzerinde 48 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 22.52 μg/mL olarak literatürde belirtilenden çok daha düşük olarak belirlenmiştir. Akım (flow) sitometrik analizi sonuçlarına göre, difraktaik asidin HeLa kanser hücre hattı üzerinde önemli derecede erken ve geç apoptotik ve nekrotik etki sergilediği gösterilmiştir. Kanser hücre hattının apoptoza yönlendirdiğinin bir göstergesi olan artan Bax/Bcl-2 oranının da önemli derecede arttığı Real-Time PCR yöntemiyle gösterilerek akım (flow) sitometrik analiz sonuçları da doğrulanmıştır. Ayrıca, transwell migrasyon analiz sonuçları difraktaik asidin HeLa hücrelerinin metastaz yapmasını önemli derecede engellediği gösterilmiştir. Difraktaik asidin HeLa kanser hücre hattında hücresinde TrxR1'in kantitatif gen ve protein ekspresyonlarını değiştirmezken TrxR1 enzim aktivitesini önemli derecede inhibe etmiştir ve asıl etkiyi posttranslasyonel seviyede göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, evernik, vulpinik ve difraktaik liken asitlerinin insan servikal kanser hücre hattı (HeLa) üzerinde antikanser etkisine bakıldı ve belirlenen antikanser etkinin tiyoredoksin redüktaz 1 (TrxR1) üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği gen ve protein seviyesinde araştırıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda aşağıdaki sonuç ve öneriler elde edildi (Şekil 32).

1. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitleri insan servikal kanser hücre hattı (HeLa) üzerine doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Bunlardan en yüksek antiproliferatif etkiyi difraktaik asit, HeLa hücresinde 48 saatlik inkübasyon neticesinde IC_{50} değeri 22,52±2,24 μg/mL olarak göstermiştir.

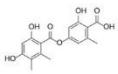
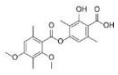
2. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitleri ile muamele edilmiş HeLa hücre hattında migrasyonu önemli derecede azalttığı gözlendi. Bu üç liken asidinin antimigratif etkisinin moleküler mekanizmasının daha sonraki çalışmalar ile aydınlatılması gerekmektedir.

3. Vulpinik, evernik ve difraktaik asitlerinin HeLa hücresinde apoptozu ve nekrozu indüklediği gözlendi. En yüksek apoptotik ve nekrotik etkiyi vulpinik asit, en düşük apoptotik ve nekrotik etkiyi ise evernik asit göstermiştir.

4. HeLa hücresinde, vulpinik liken asidinin kantitatif TrxR1 gen ekspresyonunu önemli derecede arttırırken protein ekspresyon seviyesini değiştirmediği, evernik liken asidinin TrxR1'i kantitatif ekspresyonunu hem gen hem de protein seviyesinde etkilediği ve difraktaik asidin ise TrxR1'in kantitatif gen ve protein ekspresyonlarını değiştirmediği görülmüştür. Buna rağmen, her üç liken asidinin de, HeLa kanser hücrelerinde aşırı aktivite gösteren TrxR1 enzim aktivitesini yüksek derecede önemli olarak inhibe ettiği görülmüştür. Muhtemelen her üç liken asidi de posttranslasyonel seviyede etki gösterip TrxR1 enziminin aktif bölgesine bağlanarak enzim-substrat kompleksinin oluşumunu engellemiş olabilir veya TrxR1 enzimine aktif bölgesi dışından bağlanarak aktif bölgenin üç boyutlu yapısını bozarak da enzim-substrat kompleksinin oluşumunu engellemiş olabilir. Bu durumun hesaplamalı biyokimya, protein dinamiği ve enzim kinetiği çalışmalarıyla açıklanması gerekmektedir.

5. Bu üç liken asidi, serviks kanseri için tanısal bir belirteç olan TrxR1'i için yeni bir inhibitör adayıdır. Bu sebeple serviks kanseri tedavisi için potansiyel kemoterapötik ajan olabilir.

6. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin laboratuvar ortamında türevlendirilerek HeLa hücre hattı üzerindeki *in vitro* etkilerine bakılıp bu türevlerden en etkin inhibisyon gösterenlere eklenecek fonksiyonel gruplar vasıtasıyla *in vivo* sistemde bir taşıyıcı vasıtasıyla spesifik kanser hücrelerine yönlendirilmesi hususunda oluşturulacak yeni projeler için ön çalışma niteliği taşımaktadır.

HeLa	Proliferasyon (XTT)	Toplam apoptoz (Flow)	Metastaz	Bax/Bcl-2 oranı	TrxR1 gen ekspresyonu	TrxR1 protein ekspresyonu	TrxR1 enzim aktivitesi
Vulpinik asit 	↓	↑	↓	↓	↑	↔	↓
Evernik asit 	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓
Difraktaik asit 	↓	↑	↓	↑	↔	↔	↓

Şekil 32. Vulpinik, evernik ve difraktaik liken asitlerinin insan servikal kanser hücre hattı (HeLa)üzerine tiyoredoksin redüktaz 1 hedefli antikanser etkisi. Yukarı yönlü ok işareti artışı ve aşağı yöndeki ok işareti ise azalmayı temsil etmektedir. Ok uzunluğu ile etkinlik doğru orantılıdır.

KAYNAKLAR

1. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. J Epidemiol Glob Health. 2019;9(4):217–22.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209–49.
3. Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. Curr Pharm Des. 2018;24(40):4771–8.
4. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. Redox Biol. 2019 Jul;25:101084.
5. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. Cell Death Dis. 2016;7(6):e2253.
6. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. J Exp Med. 2011 Mar 14;208(3):417–20.
7. Del Río LA, López-Huertas E. ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. Plant Cell Physiol. 2016 Jul;57(7):1364–76.
8. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:8416763.
9. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. Free Radic Res. 2010 May;44(5):479–96.
10. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol. 2014 May 19;24(10):R453-62.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
12. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. Semin Cell Dev Biol. 2018;80:50–64.
13. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. Sci Adv. 2016;2(5):e1600200.
14. Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem. 2000 Oct;267(20):6102–9.
15. Zhang J, Li X, Han X, Liu R, Fang J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. Trends Pharmacol Sci. 2017;38(9):794–808.
16. Lincoln DT, Ali Emadi EM, Tonissen KF, Clarke FM. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. Anticancer Res. 2003;23(3B):2425–33.

17. Branco V, Godinho-Santos A, Gonçalves J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition, selenium status, and Nrf-2 activation are determinant factors modulating the toxicity of mercury compounds. Free Radic Biol Med. 2014 Aug;73:95–105.
18. Shang W, Xie Z, Lu F, Fang D, Tang T, Bi R, et al. Increased Thioredoxin-1 Expression Promotes Cancer Progression and Predicts Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:9291683.
19. Lincoln DT, Al-Yatama F, Mohammed FMA, Al-Banaw AG, Al-Bader M, Burge M, et al. Thioredoxin and thioredoxin reductase expression in thyroid cancer depends on tumour aggressiveness. Anticancer Res. 2010 Mar;30(3):767–75.
20. Cai W, Zhang L, Song Y, Wang B, Zhang B, Cui X, et al. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase. Free Radic Biol Med. 2012 Jan 15;52(2):257–65.
21. Paz MM, Zhang X, Lu J, Holmgren A. A new mechanism of action for the anticancer drug mitomycin C: mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase. Chem Res Toxicol. 2012 Jul 16;25(7):1502–11.
22. Li X, Hou Y, Meng X, Ge C, Ma H, Li J, et al. Selective Activation of a Prodrug by Thioredoxin Reductase Providing a Strategy to Target Cancer Cells. Angew Chem Int Ed Engl. 2018;57(21):6141–5.
23. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. Int J Gynaecol Obstet. 2021 Oct;155 Suppl:28–44.
24. Witte A-B, Anestål K, Jerremalm E, Ehrsson H, Arnér ESJ. Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds. Free Radic Biol Med. 2005 Sep 1;39(5):696–703.
25. Hartmann JT, Lipp H-P. Toxicity of platinum compounds. Expert Opin Pharmacother. 2003 Jun;4(6):889–901.
26. Filippova M, Filippov V, Williams VM, Zhang K, Kokoza A, Bashkirova S, et al. Cellular levels of oxidative stress affect the response of cervical cancer cells to chemotherapeutic agents. Biomed Res Int. 2014;2014:574659.
27. Federico C, Sun J, Muz B, Alhallak K, Cosper PF, Muhammad N, et al. Localized Delivery of Cisplatin to Cervical Cancer Improves Its Therapeutic Efficacy and Minimizes Its Side Effect Profile. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2021;109(5):1483–94.
28. Shrivastava S, Mahantshetty U, Engineer R, Chopra S, Hawaldar R, Hande V, et al. Cisplatin Chemoradiotherapy vs Radiotherapy in FIGO Stage IIIB Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix: A Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol. 2018

Apr 1;4(4):506–13.

29. Zhu H, Tao X, Zhou L, Sheng B, Zhu X, Zhu X. Expression of thioredoxin 1 and peroxiredoxins in squamous cervical carcinoma and its predictive role in NACT. BMC Cancer. 2019 Aug 30;19(1):865.
30. Kim C, Kim B. Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: A Review. Nutrients. 2018 Aug 4;10(8).
31. Yuan R, Hou Y, Sun W, Yu J, Liu X, Niu Y, et al. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. Ann N Y Acad Sci. 2017;1401(1):19–27.
32. Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Walker DL, Webster HD. JC papovavirus large tumor (T)-antigen expression in brain tissue of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Apr;83(7):2271–5.
33. Liang Y, Liu Z-Y, Wang P-Y, Li Y-J, Wang R-R, Xie S-Y. Nanoplatform-based natural products co-delivery system to surmount cancer multidrug-resistant. J Control Release. 2021;336:396–409.
34. Fernández-Moriano C, Gómez-Serranillos MP, Crespo A. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. Pharm Biol. 2016;54(1):1–17.
35. Zambare VP, Christopher LP. Biopharmaceutical potential of lichens. Pharm Biol. 2012 Jun;50(6):778–98.
36. Solárová Z, Liskova A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D, Solár P. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites. Biomolecules. 2020;10(1).
37. Tripathi AH, Negi N, Gahtori R, Kumari A, Joshi P, Tewari LM, et al. A Review of Anti-Cancer and Related Properties of Lichen-Extracts and Metabolites. Anticancer Agents Med Chem. 2022;22(1):115–42.
38. Ozgencli I, Budak H, Ciftci M, Anar M. Lichen Acids May Be Used as A Potential Drug For Cancer Therapy; by Inhibiting Mitochondrial Thioredoxin Reductase Purified From Rat Lung. Anticancer Agents Med Chem. 2018;18(11):1599–605.
39. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, et al. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. Phytother Res. 2013 Mar;27(3):431–7.
40. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell. 2012 Jul 6;150(1):12–27.
41. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. Methods Mol Biol. 2015;1238:3–25.

42. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. Nat Commun. 2018;9(1):3490.
43. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. Science. 2017;355(6331):1330–4.
44. Song M, Giovannucci EL. Cancer risk: many factors contribute. Science. 2015 Feb 13;347(6223):728–9.
45. Dancey JE, Bedard PL, Onetto N, Hudson TJ. The genetic basis for cancer treatment decisions. Cell. 2012 Feb 3;148(3):409–20.
46. Baudino TA. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. Curr Drug Discov Technol. 2015;12(1):3–20.
47. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. Physiology (Bethesda). 2010 Apr;25(2):85–101.
48. Brown G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. Int J Mol Sci. 2021 Sep 7;22(18).
49. Croce CM. Oncogenes and cancer. N Engl J Med. 2008 Jan 31;358(5):502–11.
50. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science. 2013 Mar 29;339(6127):1546–58.
51. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. Cell. 2013 Mar 28;153(1):17–37.
52. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Am J Cancer Res. 2017;7(5):1016–36.
53. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat Rev Cancer. 2009 Mar;9(3):153–66.
54. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(6):2129–44.
55. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res. 2011 Sep 26;30:87.
56. Azad MB, Gibson SB. Role of BNIP3 in proliferation and hypoxia-induced autophagy: implications for personalized cancer therapies. Ann N Y Acad Sci. 2010 Oct;1210:8–16.
57. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell. 2004 Jan 23;116(2):205–19.
58. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. Semin Hematol. 1997 Oct;34(4 Suppl 5):9–19.

59. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. Pharm Acta Helv. 2000 Mar;74(2–3):281–6.
60. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495–516.
61. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ. 2005 Nov;12 Suppl 2:1463–7.
62. Labi V, Erlacher M. How cell death shapes cancer. Cell Death Dis. 2015 Mar 5;6:e1675.
63. Strasser A, Vaux DL. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. Mol Cell. 2020;78(6):1045–54.
64. Lim SM, Mohamad Hanif EA, Chin S-F. Is targeting autophagy mechanism in cancer a good approach? The possible double-edge sword effect. Cell Biosci. 2021 Mar 20;11(1):56.
65. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif. 2012 Dec;45(6):487–98.
66. Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. Clin Cancer Res. 2007 Dec 15;13(24):7271–9.
67. Shay JW. Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. Cancer Discov. 2016;6(6):584–93.
68. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. Annu Rev Physiol. 2013;75:685–705.
69. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. Genes Dev. 2020;34(23–24):1565–76.
70. Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B. HIFs, angiogenesis, and cancer. J Cell Biochem. 2013 May;114(5):967–74.
71. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The development of the vascular system: a historical overview. Methods Mol Biol. 2015;1214:1–14.
72. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):249–57.
73. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15–8.
74. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. Nat Med. 2006 Aug;12(8):895–904.

75. Özkara G, Öztürk O, Yılmaz Aydoğan H. Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi. Experimed. 2020 Apr 13;38–48.
76. Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. J Hematol Oncol. 2018;11(1):125.
77. Pachmayr E, Treese C, Stein U. Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology. Visc Med. 2017 Mar;33(1):11–20.
78. Sökeland G, Schumacher U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. Mol Cancer. 2019;18(1):12.
79. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature. 2016 Jan 21;529(7586):298–306.
80. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. Cell. 2016 Jun 30;166(1):21–45.
81. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. Cancer. 2021 Aug 15;127(16):3029–30.
82. Baykara O. Current Modalities in Treatment of Cancer. Balıkesır Heal Sci J. 2016;5(3):154–65.
83. Jaffray DA, Gospodarowicz MK. Radiation Therapy for Cancer. Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3). 2015.
84. Dare AJ, Anderson BO, Sullivan R, Pramesh CS, Yip C-H, Ilbawi A, et al. Surgical Services for Cancer Care. In: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3): Cancer. The World Bank; 2015. p. 223–38.
85. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. Cancer Res. 2008 Nov 1;68(21):8643–53.
86. Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. StatPearls. 2022.
87. Malik D, Mahendiratta S, Kaur H, Medhi B. Futuristic approach to cancer treatment. Gene. 2021 Dec 30;805:145906.
88. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int J Med Sci. 2012;9(3):193–9.
89. Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh K-W. Biological response of cancer cells to radiation treatment. Front Mol Biosci. 2014;1:24.
90. Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. Mol Biol Rep. 2018 Dec;45(6):2935–40.
91. Scheller EL, Krebsbach PH. Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration. J Dent Res. 2009 Jul;88(7):585–96.

92. Sankaranarayanan R WR. Anatomical and pathological basis of visual inspection with acetic acid (VIA) and with Lugol's iodine (VILI). In: A practical manual on visual screening for cervical neoplasia. IARC Technical Publication No. 41; 2003. p. 14.
93. Langreder W. Functional Anatomy of The Uterine Cervix. Arch Gynakol. 1957;189:259–68.
94. Thalappillil J. The effect of varying levels of oxygen tension on engineered cervical tissue in two-and three-dimensional culture. Tufts Unıversıty, Biomedical Sciences, Master Thesis,Massachusetts; 2011.
95. Berek JS. Berek & Novak Jinekoloji Bölüm 19. In: Erk; A, Fazlı Demirtürk, editors. Berek & Novak Jinekoloji. 15. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2017.
96. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. Cancer. 2017 Jul 1;123(13):2404–12.
97. World Health Organization. Global Cancer Observatory [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2020 [cited 2022 Feb 24]. Available from: https://gco.iarc.fr/
98. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, et al. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. Lancet Glob Heal. 2016;4(7):e453-63.
99. Chen C, Yang Z, Li Z, Li L. Accuracy of several cervical screening strategies for early detection of cervical cancer: a meta-analysis. Int J Gynecol Cancer. 2012 Jul;22(6):908–21.
100. Türkyılmaz, Murat; Öztürk, Makbule; Dündar S. 2017 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri [Internet]. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. 2017. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri
101. Green J, Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Beral V, Chilvers C, Crossley B, et al. Risk factors for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix in women aged 20-44 years: the UK National Case-Control Study of Cervical Cancer. Br J Cancer. 2003 Dec 1;89(11):2078–86.
102. Berrington de González A, Green J, International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. Int J cancer. 2007 Feb 15;120(4):885–91.
103. Hemminki K, Chen B. Familial risks for cervical tumors in full and half siblings:

etiologic apportioning. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Jul;15(7):1413–4.

104. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003 Jan;16(1):1–17.
105. Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus is resistant to desiccation. J Infect Dis. 1997 Oct;176(4):1076–9.
106. Arbyn M, de Sanjosé S, Saraiya M, Sideri M, Palefsky J, Lacey C, et al. EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. Int J cancer. 2012 Nov 1;131(9):1969–82.
107. Araldi RP, Sant'Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. Biomed Pharmacother. 2018 Oct;106:1537–56.
108. Brianti P, De Flammineis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. New Microbiol. 2017 Apr;40(2):80–5.
109. Li Y, Xu C. Human Papillomavirus-Related Cancers. Adv Exp Med Biol. 2017;1018:23–34.
110. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. J Natl Cancer Inst. 2001 Feb 21;93(4):284–92.
111. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvärd C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. Eur J Cancer. 2001 Jan;37(2):246–50.
112. Bruni L, Albero G, Serrano B MM. World: Human Papillomavirus and Related Diseases, Summary Report 2022 [Internet]. HPV Information Centre. 2022. Available from: https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf
113. Kaleli İ, Aksoy L, Demir M, Mete E, Önder SZ, Bir F, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in patients attending to gynecology polyclinics. Mikrobiyol Bul. 2019 Apr;53(2):170–8.
114. Schiffman M, Wentzensen N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2013 Apr;22(4):553–60.
115. ATAĞ İ. Türkiye Kanser Kontrol Programı [Internet]. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. 2021. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/yayinlar/raporlar/2021_Kanser_Kontrol_Programi_/17.Agustos_2021_Kanser_Kontrol_Programi_versiyon-1.pdf

116. Pimenta Ribeiro J, Borges I. Efficacy of the Vaccines Against Human Papillomavirus in Women Older than 24 Years in the Cervix Cancer Prevention. Acta Med Port. 2016 Jun;29(6):401–8.
117. World Health Organization. Electronic address: sageexecsec@who.int. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017-Recommendations. Vaccine. 2017;35(43):5753–5.
118. Sankaranarayanan R. Screening for cancer in low- and middle-income countries. Ann Glob Heal. 80(5):412–7.
119. Hutchinson ML, Isenstein LM, Goodman A, Hurley AA, Douglass KL, Mui KK, et al. Homogeneous sampling accounts for the increased diagnostic accuracy using the ThinPrep Processor. Am J Clin Pathol. 1994 Feb;101(2):215–9.
120. Lee KR, Ashfaq R, Birdsong GG, Corkill ME, McIntosh KM, Inhorn SL. Comparison of conventional Papanicolaou smears and a fluid-based, thin-layer system for cervical cancer screening. Obstet Gynecol. 1997 Aug;90(2):278–84.
121. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. Acta Cytol. 2017;61(4–5):359–72.
122. Mayer C, Mahdy H. Abnormal Papanicolaou Smear. StatPearls. 2022.
123. Basu P, Taghavi K, Hu S-Y, Mogri S, Joshi S. Management of cervical premalignant lesions. Curr Probl Cancer. 42(2):129–36.
124. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. J Natl Cancer Inst. 1999 Feb 3;91(3):252–8.
125. O'Leary JJ, White C, Spillane C, Naik P, O'Brien R, Reynolds S, et al. Cervical screening: A new way forward (tests of risk and tests of disease). HRB Open Res. 2018 Feb 28;1:3.
126. Alamy Stock Photo. Image ID:DY7W47. JACOPIN / BSIP. 2014.
127. Olawaiye AB, Baker TP, Washington MK, Mutch DG. The new (Version 9) American Joint Committee on Cancer tumor, node, metastasis staging for cervical cancer. CA Cancer J Clin. 2021;71(4):287–98.
128. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin. 2021;71(1):7–33.
129. Prepared by 191 authors and editors. Histological types of cervical cancer in the WHO Classification of Female Genital Tumours. In: Female Genital Tumours. 5th Editio. IARC; 2020.
130. Michael Frumovitz, MD M. Invasive cervical cancer: Epidemiology, risk factors, clinical manifestations, and diagnosis. Atatürk Üniversitesi, UpToDateUpToDate.

2022.

131. Wiebe E, Denny L, Thomas G. Cancer of the cervix uteri. Int J Gynaecol Obstet. 2012 Oct;119 Suppl:S100-9.
132. Narayan K, Lin MY. Staging for cervix cancer: Role of radiology, surgery and clinical assessment. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2015 Aug;29(6):833–44.
133. Dargent D. Diagnosis, classification and prognosis of cancer of the uterine cervix. Rev Prat. 1990 Jan 1;40(1):19–25.
134. de Gregorio A, Widschwendter P, Ebner F, Friedl TWP, Huober J, Janni W, et al. Influence of the New FIGO Classification for Cervical Cancer on Patient Survival: A Retrospective Analysis of 265 Histologically Confirmed Cases with FIGO Stages IA to IIB. Oncology. 2020;98(2):91–7.
135. Wright JD, Matsuo K, Huang Y, Tergas AI, Hou JY, Khoury-Collado F, et al. Prognostic Performance of the 2018 International Federation of Gynecology and Obstetrics Cervical Cancer Staging Guidelines. Obstet Gynecol. 2019;134(1):49–57.
136. Salib MY, Russell JHB, Stewart VR, Sudderuddin SA, Barwick TD, Rockall AG, et al. 2018 FIGO Staging Classification for Cervical Cancer: Added Benefits of Imaging. Radiographics. 2020 Oct;40(6):1807–22.
137. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. Int J Gynaecol Obstet. 2018 Oct;143 Suppl:22–36.
138. Somashekhar SP, Ashwin KR. Management of Early Stage Cervical Cancer. Rev Recent Clin Trials. 2015;10(4):302–8.
139. Querleu D, Cibula D, Abu-Rustum NR. 2017 Update on the Querleu-Morrow Classification of Radical Hysterectomy. Ann Surg Oncol. 2017 Oct;24(11):3406–12.
140. Kuznicki ML, Chambers LM, Morton M, Son J, Horowitz M, Crean-Tate KK, et al. Fertility-Sparing Surgery for Early-Stage Cervical Cancer: A Systematic Review of the Literature. J Minim Invasive Gynecol. 2021;28(3):513-526.e1.
141. Bansal N, Herzog TJ, Shaw RE, Burke WM, Deutsch I, Wright JD. Primary therapy for early-stage cervical cancer: radical hysterectomy vs radiation. Am J Obstet Gynecol. 2009 Nov;201(5):485.e1-9.
142. Koh W-J, Abu-Rustum NR, Bean S, Bradley K, Campos SM, Cho KR, et al. Cervical Cancer, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2019;17(1):64–84.
143. Querleu D, Morrow CP. Classification of radical hysterectomy. Lancet Oncol. 2008 Mar;9(3):297–303.
144. Piver MS, Rutledge F, Smith JP. Five classes of extended hysterectomy for women

with cervical cancer. Obstet Gynecol. 1974 Aug;44(2):265–72.

145. Michael Straughn, Jr, MDCatherine Yaşar D. Management of early-stage cervical cancer [Internet]. Atatürk Üniversitesi, UpToDate. 2022 [cited 2022 Feb 20]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/management-of-early-stage-cervical-cancer?
146. Wang L, Liu S, Xu T, Yuan L, Yang X. Sentinel lymph node mapping in early-stage cervical cancer: Meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2021 Aug 27;100(34):e27035.
147. Zaccarini F, Sanson C, Maulard A, Schérier S, Leary A, Pautier P, et al. Cervical Cancer and Fertility-Sparing Treatment. J Clin Med. 2021 Oct 21;10(21).
148. Zigras T, Lennox G, Willows K, Covens A. Early Cervical Cancer: Current Dilemmas of Staging and Surgery. Curr Oncol Rep. 2017 Aug;19(8):51.
149. Saleh M, Virarkar M, Javadi S, Elsherif SB, de Castro Faria S, Bhosale P. Cervical Cancer: 2018 Revised International Federation of Gynecology and Obstetrics Staging System and the Role of Imaging. AJR Am J Roentgenol. 2020;214(5):1182–95.
150. Niikura H, Okamoto S, Otsuki T, Yoshinaga K, Utsunomiya H, Nagase S, et al. Prospective study of sentinel lymph node biopsy without further pelvic lymphadenectomy in patients with sentinel lymph node-negative cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 2012 Sep;22(7):1244–50.
151. Cao T, Feng Y, Huang Q, Wan T, Liu J. Prognostic and Safety Roles in Laparoscopic Versus Abdominal Radical Hysterectomy in Cervical Cancer: A Meta-analysis. J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2015 Dec;25(12):990–8.
152. Kucukmetin A, Biliatis I, Naik R, Bryant A. Laparoscopically assisted radical vaginal hysterectomy versus radical abdominal hysterectomy for the treatment of early cervical cancer. Cochrane database Syst Rev. 2013 Oct 1;(10):CD006651.
153. Ramirez PT, Frumovitz M, Pareja R, Lopez A, Vieira M, Ribeiro R, et al. Minimally Invasive versus Abdominal Radical Hysterectomy for Cervical Cancer. N Engl J Med. 2018 Nov 15;379(20):1895–904.
154. Wenzel HHB, Smolders RG V, Beltman JJ, Lambrechts S, Trum HW, Yigit R, et al. Survival of patients with early-stage cervical cancer after abdominal or laparoscopic radical hysterectomy: a nationwide cohort study and literature review. Eur J Cancer. 2020;133:14–21.
155. Chiva L, Zanagnolo V, Querleu D, Martin-Calvo N, Arévalo-Serrano J, Căpîlna ME, et al. SUCCOR study: an international European cohort observational study comparing minimally invasive surgery versus open abdominal radical hysterectomy in patients with stage IB1 cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 2020;30(9):1269–77.

156. Gray HJ. Primary management of early stage cervical cancer (IA1-IB) and appropriate selection of adjuvant therapy. J Natl Compr Canc Netw. 2008 Jan;6(1):47–52.
157. Falcetta FS, Medeiros LR, Edelweiss MI, Pohlmann PR, Stein AT, Rosa DD. Adjuvant platinum-based chemotherapy for early stage cervical cancer. Cochrane database Syst Rev. 2016;11:CD005342.
158. Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. J Clin Oncol. 2000 Apr;18(8):1606–13.
159. Sedlis A, Bundy BN, Rotman MZ, Lentz SS, Muderspach LI, Zaino RJ. A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: A Gynecologic Oncology Group Study. Gynecol Oncol. 1999 May;73(2):177–83.
160. Gadducci A, Cosio S. Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Cervical Cancer: Review of the Literature and Perspectives of Clinical Research. Anticancer Res. 2020 Sep;40(9):4819–28.
161. Lapaille L, De Cuypere M, Goffin F, Kakkos A, Gonne E, Hermesse J, et al. Locally-advanced cervix cancer : multidisciplinary management. Rev Med Liege. 2021;76(5–6):507–14.
162. Fachini AMD, Zuliani AC, Sarian LO, Teixeira JC, Esteves SCB, da Costa Machado H, et al. Long-term outcomes of concomitant cisplatin plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with stage IIIB squamous cervical cancer: A randomized controlled trial. Gynecol Oncol. 2021;160(2):379–83.
163. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-analysis Collaboration (CCCMAC). Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: individual patient data meta-analysis. Cochrane database Syst Rev. 2010 Jan 20;(1):CD008285.
164. Dueñas-González A, Zarbá JJ, Patel F, Alcedo JC, Beslija S, Casanova L, et al. Phase III, open-label, randomized study comparing concurrent gemcitabine plus cisplatin and radiation followed by adjuvant gemcitabine and cisplatin versus concurrent cisplatin and radiation in patients with stage IIB to IVA carcinoma of the cervix. J Clin Oncol. 2011 May 1;29(13):1678–85.
165. Kim YS, Shin SS, Nam J-H, Kim Y-T, Kim Y-M, Kim JH, et al. Prospective randomized comparison of monthly fluorouracil and cisplatin versus weekly cisplatin concurrent with pelvic radiotherapy and high-dose rate brachytherapy for locally

advanced cervical cancer. Gynecol Oncol. 2008 Jan;108(1):195–200.

166. Morice P, Rouanet P, Rey A, Romestaing P, Houvenaeghel G, Boulanger JC, et al. Results of the GYNECO 02 study, an FNCLCC phase III trial comparing hysterectomy with no hysterectomy in patients with a (clinical and radiological) complete response after chemoradiation therapy for stage IB2 or II cervical cancer. Oncologist. 2012;17(1):64–71.

167. Park KJ, Braschi-Amirfarzan M, DiPiro PJ, Giardino AA, Jagannathan JP, Howard SA, et al. Multimodality imaging of locally recurrent and metastatic cervical cancer: emphasis on histology, prognosis, and management. Abdom Radiol (New York). 2016;41(12):2496–508.

168. Fulcher AS, O'Sullivan SG, Segreti EM, Kavanagh BD. Recurrent cervical carcinoma: typical and atypical manifestations. Radiographics. 1999 Oct;19 Spec No:S103-16; quiz S264-5.

169. Li H, Wu X, Cheng X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. J Gynecol Oncol. 2016 Jul;27(4):e43.

170. Kitagawa R, Katsumata N, Shibata T, Kamura T, Kasamatsu T, Nakanishi T, et al. Paclitaxel Plus Carboplatin Versus Paclitaxel Plus Cisplatin in Metastatic or Recurrent Cervical Cancer: The Open-Label Randomized Phase III Trial JCOG0505. J Clin Oncol. 2015 Jul 1;33(19):2129–35.

171. Lorusso D, Petrelli F, Coinu A, Raspagliesi F, Barni S. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. Gynecol Oncol. 2014 Apr;133(1):117–23.

172. Monk BJ, Sill MW, McMeekin DS, Cohn DE, Ramondetta LM, Boardman CH, et al. Phase III trial of four cisplatin-containing doublet combinations in stage IVB, recurrent, or persistent cervical carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. J Clin Oncol. 2009 Oct 1;27(28):4649–55.

173. Long HJ, Bundy BN, Grendys EC, Benda JA, McMeekin DS, Sorosky J, et al. Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol. 2005 Jul 20;23(21):4626–33.

174. Scatchard K, Forrest JL, Flubacher M, Cornes P, Williams C. Chemotherapy for metastatic and recurrent cervical cancer. Cochrane database Syst Rev. 2012 Oct 17;10:CD006469.

175. Penson RT, Huang HQ, Wenzel LB, Monk BJ, Stockman S, Long HJ, et al. Bevacizumab for advanced cervical cancer: patient-reported outcomes of a

randomised, phase 3 trial (NRG Oncology-Gynecologic Oncology Group protocol 240). Lancet Oncol. 2015 Mar;16(3):301–11.

176. Verheyen A, Peeraer E, Lambrechts D, Poesen K, Carmeliet P, Shibuya M, et al. Therapeutic potential of VEGF and VEGF-derived peptide in peripheral neuropathies. Neuroscience. 2013 Aug 6;244:77–89.
177. Verhoeven Y, Quatannens D, Trinh XB, Wouters A, Smits ELJ, Lardon F, et al. Targeting the PD-1 Axis with Pembrolizumab for Recurrent or Metastatic Cancer of the Uterine Cervix: A Brief Update. Int J Mol Sci. 2021 Feb 11;22(4).
178. Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M, Gynecology Cancer Disease Site Group. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. Gynecol Oncol. 2009 Sep;114(3):528–35.
179. Cibula D, Dostálek L, Jarkovsky J, Mom CH, Lopez A, Falconer H, et al. The annual recurrence risk model for tailored surveillance strategy in patients with cervical cancer. Eur J Cancer. 2021 Oct 16;158:111–22.
180. Morice P, Deyrolle C, Rey A, Atallah D, Pautier P, Camatte S, et al. Value of routine follow-up procedures for patients with stage I/II cervical cancer treated with combined surgery-radiation therapy. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2004 Feb;15(2):218–23.
181. Salani R, Khanna N, Frimer M, Bristow RE, Chen L-M. An update on post-treatment surveillance and diagnosis of recurrence in women with gynecologic malignancies: Society of Gynecologic Oncology (SGO) recommendations. Gynecol Oncol. 2017;146(1):3–10.
182. Patel CN, Nazir SA, Khan Z, Gleeson F V, Bradley KM. 18F-FDG PET/CT of cervical carcinoma. AJR Am J Roentgenol. 2011 May;196(5):1225–33.
183. J Michael Straughn, Jr M. Invasive cervical cancer: Patterns of recurrence and post-treatment surveillance [Internet]. Atatürk Üniversitesi, UpToDate. 2022 [cited 2022 Feb 14]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/invasive-cervical-cancer-patterns-of-recurrence-and-post-treatment-surveillance?
184. Leitao MM, Chi DS. Recurrent cervical cancer. Curr Treat Options Oncol. 2002 Apr;3(2):105–11.
185. Potter ME, Alvarez RD, Gay FL, Shingleton HM, Soong SJ, Hatch KD. Optimal therapy for pelvic recurrence after radical hysterectomy for early-stage cervical cancer. Gynecol Oncol. 1990 Apr;37(1):74–7.
186. Moreira ASL, Cunha TM, Esteves S. Cervical cancer recurrence - can we predict the type of recurrence? Diagn Interv Radiol. 2020 Sep;26(5):403–10.

187. Sardain H, Lavoue V, Redpath M, Bertheuil N, Foucher F, Levêque J. Curative pelvic exenteration for recurrent cervical carcinoma in the era of concurrent chemotherapy and radiation therapy. A systematic review. Eur J Surg Oncol. 2015 Aug;41(8):975–85.
188. Grimes WR, Stratton M. Pelvic Exenteration. StatPearls. 2022.
189. Koh CE, Solomon MJ, Brown KG, Austin K, Byrne CM, Lee P, et al. The Evolution of Pelvic Exenteration Practice at a Single Center: Lessons Learned from over 500 Cases. Dis Colon Rectum. 2017 Jun;60(6):627–35.
190. O'Connell C, Mirhashemi R, Kassira N, Lambrou N, McDonald WS. Formation of functional neovagina with vertical rectus abdominis musculocutaneous (VRAM) flap after total pelvic exenteration. Ann Plast Surg. 2005 Nov;55(5):470–3.
191. Rietjens M, Maggioni A, Bocciolone L, Sideri M, Youssef O, Petit J-Y. Vaginal reconstruction after extended radical pelvic surgery for cancer: comparison of two techniques. Plast Reconstr Surg. 2002 Apr 15;109(5):1592–7; discussion 1598-9.
192. PelvEx Collaborative. Minimally invasive surgery techniques in pelvic exenteration: a systematic and meta-analysis review. Surg Endosc. 2018;32(12):4707–15.
193. Bizzarri N, Chiantera V, Ercoli A, Fagotti A, Tortorella L, Conte C, et al. Minimally Invasive Pelvic Exenteration for Gynecologic Malignancies: A Multi-Institutional Case Series and Review of the Literature. J Minim Invasive Gynecol. 2019;26(7):1316–26.
194. Jain V, Debnath S, Rawal S. Salvage robotic anterior pelvic exenteration for cervical cancer: technique and feasibility. J Robot Surg. 2021 Dec;15(6):945–53.
195. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. Nat Rev Drug Discov. 2013 Dec;12(12):931–47.
196. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer. 2011 Feb;11(2):85–95.
197. Sarniak A, Lipińska J, Tytman K, Lipińska S. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2016 Nov 14;70:1150–65.
198. Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? Nutrients. 2019 Sep 4;11(9).
199. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. Biomed Pharmacother. 2018 Dec;108:656–62.
200. Kim Y-W, Byzova T V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. Blood. 2014 Jan 30;123(5):625–31.

201. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian J Clin Biochem. 2015 Jan;30(1):11–26.
202. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? Nat Rev Cancer. 2014 Nov;14(11):709–21.
203. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 2006 Mar 10;160(1):1–40.
204. Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. Trends Cell Biol. 2020;30(6):440–51.
205. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. Biomolecules. 2019;9(11).
206. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist Updat. 2004 Apr;7(2):97–110.
207. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. Cell Physiol Biochem. 2017;44(2):532–53.
208. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. Free Radic Biol Med. 2014 Jan;66:75–87.
209. Liu Y, Feng X, Yu Y, Zhao Q, Tang C, Zhang J. A review of bioselenol-specific fluorescent probes: Synthesis, properties, and imaging applications. Anal Chim Acta. 2020 May 8;1110:141–50.
210. Jia J-J, Geng W-S, Wang Z-Q, Chen L, Zeng X-S. The role of thioredoxin system in cancer: strategy for cancer therapy. Cancer Chemother Pharmacol. 2019;84(3):453–70.
211. Arnér ESJ, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. Semin Cancer Biol. 2006 Dec;16(6):420–6.
212. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 2001 Dec 1;31(11):1287–312.
213. Ghareeb H, Metanis N. The Thioredoxin System: A Promising Target for Cancer Drug Development. Chemistry. 2020 Aug 12;26(45):10175–84.
214. Watanabe R, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. Pharmacol Ther. 2010 Sep;127(3):261–70.
215. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian

thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. EMBO J. 1998 May 1;17(9):2596–606.

216. Mitchell DA, Marletta MA. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. Nat Chem Biol. 2005 Aug;1(3):154–8.

217. Shelar SB, Kaminska KK, Reddy SA, Kumar D, Tan C-T, Yu VC, et al. Thioredoxin-dependent regulation of AIF-mediated DNA damage. Free Radic Biol Med. 2015 Oct;87:125–36.

218. Meuillet EJ, Mahadevan D, Berggren M, Coon A, Powis G. Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. Arch Biochem Biophys. 2004 Sep 15;429(2):123–33.

219. Tonissen KF, Di Trapani G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. Mol Nutr Food Res. 2009 Jan;53(1):87–103.

220. Mohammadi F, Soltani A, Ghahremanloo A, Javid H, Hashemy SI. The thioredoxin system and cancer therapy: a review. Cancer Chemother Pharmacol. 2019 Nov;84(5):925–35.

221. Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. Cancer Res. 2002 Sep 1;62(17):5089–95.

222. Grogan TM, Fenoglio-Prieser C, Zeheb R, Bellamy W, Frutiger Y, Vela E, et al. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. Hum Pathol. 2000 Apr;31(4):475–81.

223. Bjørklund G, Zou L, Wang J, Chasapis CT, Peana M. Thioredoxin reductase as a pharmacological target. Pharmacol Res. 2021;174:105854.

224. Fang J, Lu J, Holmgren A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. J Biol Chem. 2005 Jul 1;280(26):25284–90.

225. Shao F-Y, Du Z-Y, Ma D-L, Chen W-B, Fu W-Y, Ruan B-B, et al. B5, a thioredoxin reductase inhibitor, induces apoptosis in human cervical cancer cells by suppressing the thioredoxin system, disrupting mitochondrion-dependent pathways and triggering autophagy. Oncotarget. 2015 Oct 13;6(31):30939–56.

226. Zhang J, Li Y, Duan D, Yao J, Gao K, Fang J. Inhibition of thioredoxin reductase by alantolactone prompts oxidative stress-mediated apoptosis of HeLa cells. Biochem

Pharmacol. 2016 Feb 15;102:34–44.

227. Zhao R, Masayasu H, Holmgren A. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 25;99(13):8579–84.
228. Ren X, Zou L, Lu J, Holmgren A. Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic. Free Radic Biol Med. 2018;127:238–47.
229. Zheng X, Ma W, Sun R, Yin H, Lin F, Liu Y, et al. Butaselen prevents hepatocarcinogenesis and progression through inhibiting thioredoxin reductase activity. Redox Biol. 2018;14:237–49.
230. Fang L-J, Shao X-T, Wang S, Lu G-H, Xu T, Zhou J-Y. Sesquiterpene lactone parthenolide markedly enhances sensitivity of human A549 cells to low-dose oxaliplatin via inhibition of NF-kappaB activation and induction of apoptosis. Planta Med. 2010 Feb;76(3):258–64.
231. Lee J, Hwangbo C, Lee JJ, Seo J, Lee J-H. The sesquiterpene lactone eupatolide sensitizes breast cancer cells to TRAIL through down-regulation of c-FLIP expression. Oncol Rep. 2010 Jan;23(1):229–37.
232. Lesiak K, Koprowska K, Zalesna I, Nejc D, Düchler M, Czyz M. Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows anticancer activity against human melanoma cells in vitro. Melanoma Res. 2010 Feb;20(1):21–34.
233. Cotugno R, Fortunato R, Santoro A, Gallotta D, Braca A, De Tommasi N, et al. Effect of sesquiterpene lactone coronopilin on leukaemia cell population growth, cell type-specific induction of apoptosis and mitotic catastrophe. Cell Prolif. 2012 Feb;45(1):53–65.
234. Rasul A, Khan M, Yu B, Ali M, Bo YJ, Yang H, et al. Isoalantolactone, a sesquiterpene lactone, induces apoptosis in SGC-7901 cells via mitochondrial and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. Arch Pharm Res. 2013 Oct;36(10):1262–9.
235. Shao F-Y, Wang S, Li H-Y, Chen W-B, Wang G-C, Ma D-L, et al. EM23, a natural sesquiterpene lactone, targets thioredoxin reductase to activate JNK and cell death pathways in human cervical cancer cells. Oncotarget. 2016 Feb 9;7(6):6790–808.
236. Shen D-W, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. Pharmacol Rev. 2012 Jul;64(3):706–21.
237. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene. 2003 Oct 20;22(47):7265–79.

238. Wangpaichitr M, Sullivan EJ, Theodoropoulos G, Wu C, You M, Feun LG, et al. The relationship of thioredoxin-1 and cisplatin resistance: its impact on ROS and oxidative metabolism in lung cancer cells. Mol Cancer Ther. 2012 Mar;11(3):604–15.
239. Efferth T. Editorial: Chemoprevention of cancer by natural products. Cancer Lett. 2019;459:13–4.
240. Cragg GM, Pezzuto JM. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. Med Princ Pract. 2016;25 Suppl 2:41–59.
241. Kingston DGI, Newman DJ. Mother nature's combinatorial libraries; their influence on the synthesis of drugs. Curr Opin Drug Discov Devel. 2002 Mar;5(2):304–16.
242. Kingston DGI. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. J Nat Prod. 2011 Mar 25;74(3):496–511.
243. Fabiani R. Antitumoral Properties of Natural Products. Molecules. 2020 Feb 3;25(3).
244. Calcott MJ, Ackerley DF, Knight A, Keyzers RA, Owen JG. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. Chem Soc Rev. 2018 Mar 5;47(5):1730–60.
245. Ulus G. Antiangiogenic properties of lichen secondary metabolites. Phytother Res. 2021 Jun;35(6):3046–58.
246. Micheletti AC, Honda NK, Ravaglia LM, Matayoshi T, Spielmann AA. Antibacterial potencial of 12 Lichen species. An Acad Bras Cienc. 2021;93(4).
247. Furmanek Ł, Czarnota P, Seaward MRD. Antifungal activity of lichen compounds against dermatophytes: a review. J Appl Microbiol. 2019 Aug;127(2):308–25.
248. Singh N, Nambiar D, Kale RK, Singh RP. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. Nutr Cancer. 2013;65 Suppl 1:36–43.
249. Aoussar N, Laasri FE, Bourhia M, Manoljovic N, Mhand RA, Rhallabi N, et al. Phytochemical Analysis, Cytotoxic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Lichens. Evid Based Complement Alternat Med. 2020;2020:8104538.
250. Zhou R, Yang Y, Park S-Y, Nguyen TT, Seo Y-W, Lee KH, et al. The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis. Sci Rep. 2017;7(1):8136.
251. Yurdacan B, Egeli U, Eskiler GG, Eryilmaz IE, Cecener G, Tunca B. The role of usnic acid-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma. Hum Exp Toxicol. 2019 Feb;38(2):201–15.
252. Burlando B, Ranzato E, Volante A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing

by different lichen compounds. Planta Med. 2009 May;75(6):607–13.

253. Emsen B, Aslan A, Togar B, Turkez H. In vitro antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. Pharm Biol. 2016 Sep;54(9):1748–62.

254. Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R, et al. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. Minerva Ginecol. 1999 Jun;51(6):255–60.

255. Pyrczak-Felczykowska A, Narlawar R, Pawlik A, Guzow-Krzemińska B, Artymiuk D, Hać A, et al. Synthesis of Usnic Acid Derivatives and Evaluation of Their Antiproliferative Activity against Cancer Cells. J Nat Prod. 2019;82(7):1768–78.

256. Hong J-M, Suh S-S, Kim TK, Kim JE, Han SJ, Youn UJ, et al. Anti-Cancer Activity of Lobaric Acid and Lobarstin Extracted from the Antarctic Lichen Stereocaulon alpnum. Molecules. 2018 Mar 14;23(3).

257. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Bellio P, Bozzi A, Amicosante G, et al. Protolichesterinic acid enhances doxorubicin-induced apoptosis in HeLa cells in vitro. Life Sci. 2016 Aug 1;158:89–97.

258. Cansaran-Duman D, Guney Eskiler G, Colak B, Sozen Kucukkara E. Vulpinic acid as a natural compound inhibits the proliferation of metastatic prostate cancer cells by inducing apoptosis. Mol Biol Rep. 2021 Aug;48(8):6025–34.

259. Nadir MT, Rashan LJ, Ayoub MT, Awni LT. Antibacterial and antiproliferative activities of vulpinic acids in vitro. Farmaco. 1992 May;47(5):643–7.

260. Kılıç N, Aras S, Cansaran-Duman D. Determination of Vulpinic Acid Effect on Apoptosis and mRNA Expression Levels in Breast Cancer Cell Lines. Anticancer Agents Med Chem. 2018;18(14):2032–41.

261. Kılıc N, Derici MK, Buyuk I, Aydın SS, Aras S, Duman DC. Evaluation of in vitro Anticancer Activity of Vulpinic Acid and its Apoptotic Potential Using Gene Expression and Protein Analysis. Indian J Pharm Educ Res [Internet]. 2018 Jun 15;52(4):626–34. Available from: http://www.ijper.org/article/853

262. Koparal AT. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)-usnic acid and vulpinic acid. Z Naturforsch C. 2015;70(5–6):159–64.

263. Cansaran-Duman D, Yangın S, Çolak B. The role of vulpinic acid as a natural compound in the regulation of breast cancer-associated miRNAs. Biol Res. 2021 Nov 7;54(1):37.

264. Studzińska-Sroka E, Majchrzak-Celińska A, Zalewski P, Szwajgier D, Baranowska-Wójcik E, Kaproń B, et al. Lichen-Derived Compounds and Extracts as Biologically

Active Substances with Anticancer and Neuroprotective Properties. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Dec 10;14(12).

265. Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B. Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. Food Chem Toxicol. 2013 Mar;53:112–8.
266. Shameera Ahamed TK, Rajan VK, Sabira K, Muraleedharan K. DFT and QTAIM based investigation on the structure and antioxidant behavior of lichen substances Atranorin, Evernic acid and Diffractaic acid. Comput Biol Chem. 2019 Jun;80:66–78.
267. Lee S, Suh YJ, Yang S, Hong DG, Ishigami A, Kim H, et al. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Evernic Acid in an MPTP-Induced Parkinson's Disease Model. Int J Mol Sci. 2021 Feb 20;22(4).
268. de Castro Fonseca J, de Oliveira YS, Bezerra BP, Ellena J, Honda NK, Silva CVNS, et al. Diffractaic acid: Crystalline structure and physicochemical characterization. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2016;165:26–32.
269. Silva CVNS, Barbosa JAP, Ferraz MS, Silva NH, Honda NK, Rabello MM, et al. Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP-β-CD inclusion complex encapsulated in microspheres. Int J Biol Macromol. 2016 Nov;92:494–503.
270. Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, et al. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. Phytomedicine. 2006 Sep;13(8):584–90.
271. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of Usnea diffracta. Planta Med. 1995 Apr;61(2):113–5.
272. Emsen B, Aslan A, Turkez H, Joughi A, Kaya A. The anti-cancer efficacies of diffractaic, lobaric, and usnic acid: In vitro inhibition of glioma. J Cancer Res Ther. 14(5):941–51.
273. Kumar KC, Müller K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. J Nat Prod. 1999 Jun;62(6):821–3.
274. Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. G3 (Bethesda). 2013 Aug 7;3(8):1213–24.
275. Lin J, Chen L, Jiang W, Zhang H, Shi Y, Cai W. Rapid detection of low-level HeLa cell contamination in cell culture using nested PCR. J Cell Mol Med. 2019;23(1):227–36.

276. Edmondson DG, Norris SJ. In Vitro Cultivation of the Syphilis Spirochete Treponema pallidum. Curr Protoc. 2021 Feb 17;1(2).
277. Liu X, Rodeheaver DP, White JC, Wright AM, Walker LM, Zhang F, et al. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. Regul Toxicol Pharmacol. 2018 Aug;97:24–32.
278. Zheng H, Ke X, Li D, Wang Q, Wang J, Liu X, et al. NEDD4 promotes cell growth and motility in hepatocellular carcinoma. Cell Cycle. 2018;17(6):728–38.
279. Kraus D, Wolfgarten M, Enkling N, Helfgen E-H, Frentzen M, Probstmeier R, et al. In-vitro cytocompatibility of dental resin monomers on osteoblast-like cells. J Dent. 2017 Oct;65:76–82.
280. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. Cold Spring Harb Protoc. 2016;2016(11).
281. Cheng J-S, Chou C-T, Liu Y-Y, Sun W-C, Shieh P, Kuo D-H, et al. The effect of oleuropein from olive leaf (Olea europaea) extract on Ca^{2+} homeostasis, cytotoxicity, cell cycle distribution and ROS signaling in HepG2 human hepatoma cells. Food Chem Toxicol. 2016 May;91:151–66.
282. Coffey K, Blackburn TJ, Cook S, Golding BT, Griffin RJ, Hardcastle IR, et al. Characterisation of a Tip60 specific inhibitor, NU9056, in prostate cancer. PLoS One. 2012;7(10):e45539.
283. Altay A, Caglar S, Caglar B. Silver(I) complexes containing diclofenac and niflumic acid induce apoptosis in human-derived cancer cell lines. Arch Physiol Biochem. 2022 Feb;128(1):69–79.
284. Zhang K, Che S, Pan C, Su Z, Zheng S, Yang S, et al. The SHH/Gli axis regulates CD90-mediated liver cancer stem cell function by activating the IL6/JAK2 pathway. J Cell Mol Med. 2018;22(7):3679–90.
285. Karaca E. İnsan Karaciğer Kanser Hücre Hattı Üzerine Liken Asitlerinin Tiyoredoksin Redüktaz Hedefli Antikanser Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Yüksek Lisans Tezi; 2021.
286. Kalın ŞN. İnsan Meme Kanser Hücre Hatları Üzerine Bazı Liken Asitlerinin Tiyoredoksin Sistem Hedefli Antikanser Etkisinin Gen ve Protein seviyesinde Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Doktora Tezi; 2022.
287. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time

quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402–8.

288. Shankaranarayanan P, Nigam S. IL-4 induces apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells: evidence for the pivotal role of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid binding to activated peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcription factor. J Immunol. 2003 Jan 15;170(2):887–94.
289. Çakır ŞN. TİP60 Geninin Fare Karaciğer Dokusundaki İnflamasyon Yolağı Üzerine Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Yüksek Lisans Tezi; 2016.
290. Altun S, Budak H. The protective effect of the cardiac thioredoxin system on the heart in the case of iron overload in mice. J Trace Elem Med Biol. 2021 Mar;64:126704.
291. Budak, Harun; Koçpınar, Enver; Gönül, Nurdan; Kalın ŞN. Western Blot Tekniği. In: DAYTAM, editor. III Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Lisansüstü Yaz Okulu [Internet]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi-DAYTAM; 2016. Available from: https://umbt.atauni.edu.tr/
292. Güller P, Budak H, Şişecioğlu M, Çiftci M. An in vivo and in vitro comparison of the effects of amoxicillin, gentamicin, and cefazolin sodium antibiotics on the mouse hepatic and renal glutathione reductase enzyme. J Biochem Mol Toxicol. 2020 Jul;34(7):e22496.
293. Hill KE, McCollum GW, Burk RF. Determination of thioredoxin reductase activity in rat liver supernatant. Anal Biochem. 1997 Nov 1;253(1):123–5.
294. Sönmez Aydın F, Hukkamlı B, Budak H. Coaction of hepatic thioredoxin and glutathione systems in iron overload-induced oxidative stress. J Biochem Mol Toxicol. 2021 Apr;35(4):e22704.
295. American Cancer Society [Internet]. 2022. Available from: www.cancer.org
296. Loud JT, Murphy J. Cancer Screening and Early Detection in the 21st Century. Semin Oncol Nurs. 2017;33(2):121–8.
297. Shrestha G, El-Naggar AM, St Clair LL, O'Neill KL. Anticancer activities of selected species of North American lichen extracts. Phytother Res. 2015 Jan;29(1):100–7.
298. Moghaddam G, Ebrahimi SA, Rahbar-Roshandel N, Foroumadi A. Antiproliferative activity of flavonoids: influence of the sequential methoxylation state of the flavonoid structure. Phytother Res. 2012 Jul;26(7):1023–8.
299. Mondal S, Bandyopadhyay S, Ghosh MK, Mukhopadhyay S, Roy S, Mandal C. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. Anticancer Agents Med Chem [Internet]. 2012 Jan;12(1):49–75. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707502

300. Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Z Naturforsch C. 65(3–4):157–73.

301. Şükran G. Liken Asitlerinin İnsan Akciğer Kanser Hücre Hattı Üzerine Tiyoredoksin Redüktaz Hedefli Antikanser Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması. Atatürk Üniversitesi,Fen Fakltesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Yüksek Lisans Tezi; 2021.

302. Yang Y, Du X, Wang Q, Liu J, Zhang E, Sai L, et al. Mechanism of cell death induced by silica nanoparticles in hepatocyte cells is by apoptosis. Int J Mol Med. 2019 Jul 5;

303. Kizil HE, Ağar G, Anar M. Cytotoxic and antiproliferative effects of evernic acid on HeLa cell lines: A candidate anticancer drug. J Biotechnol. 2014 Sep;185:S29.