



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI *Cladonia* (L.) LİKEN TÜRLERİNDEN BİYOLOJİK SENTEZ
YOLUYLA ELDE EDİLEN ÇİÇEK ŞEKLİ HİBRİT
NANOYAPILARIN ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
VE MOLEKÜLER BİYOLOJİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYDA AKÇA

HAZİRAN

ŞEYDA AKÇA	BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI	HAZİRAN 2025
------------	-----------------------------	--------------

**FARKLI *Cladonia* (L.) LİKEN TÜRLERİNDEN BİYOLOJİK SENTEZ
YOLUYLA ELDE EDİLEN ÇİÇEK ŞEKLİ HİBRİT NANOYAPILARIN
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
BİYOLOJİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Şeyda AKÇA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2025

Yüksek Lisans Tezi Kabul ve Onay Sayfası

Şeyda AKÇA tarafından hazırlanan “Farklı *Cladonia* (L.) Liken Türlerinden Biyolojik Sentez Yoluyla Elde Edilen Çiçek Şekilli Hibrit Nanoyapıların Antikanser Etkilerinin Araştırılması ve Moleküler Biyolojik Açıdan Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Doç. Dr. Ece AVULOĞLU YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Cumhur AVŞAR

Biyoloji Anabilim Dalı, Sinop Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 18.06.2025

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Şeyda AKÇA

18.06.2025

FARKLI *Cladonia* (L.) LİKEN TÜRLERİNDEN BİYOLOJİK SENTEZ YOLUYLA
ELDE EDİLEN ÇİÇEK ŞEKLİLİ HİBRİT NANOYAPILARIN ANTİKANSER
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
BİYOLOJİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Şeyda AKÇA

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAZİRAN 2025

ÖZET

Nanopartiküller, nanometre ölçeğinde boyutlara sahip olan ve bu özelliklerinden dolayı bir dizi endüstriyel, tıbbi ve bilimsel uygulamalar için çeşitli olanaklar sunan yapılardır. Bu da, nanopartiküllerin ilaç geliştirme, görüntüleme teknikleri, kataliz, enerji depolama ve sensör teknolojileri gibi birçok alanda kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Nanopartiküllerin biyolojik sentezi, biyolojik organizmaların veya onların bileşenlerinin kullanılması yoluyla nanopartikül üretimini ifade etmektedir. Bu yöntem, geleneksel kimyasal sentez yöntemlerine alternatif olarak çevre dostu ve etkili bir yaklaşım sunar. Biyolojik sentez; genellikle bitkiler, bakteriler, likenler, mantarlar veya diğer mikroorganizmaların özünden elde edilen biyolojik ajanların kullanımını içerir. Özellikle bitki özleri ve likenler, nanopartikül sentezi için gerekli olan metal tuzlarını indirgeyerek veya çökeltirerek nanopartiküllerin oluşumunu sağlamaktadır. Bu çalışmada; bakır-nano-flower kompozit malzemenin biyolojik sentezi için *Cladonia rangiformis* likeni ve *Cladonia subulata* liken özütü kullanılmıştır. Sentezlenen bakır-nano-flower kompozit malzemenin kanser hücresi (DLD-1 kolon kanseri ve CCD18-Co sağlıklı kolon hücreleri) üzerine etkileri, kanser yolağında yer alan *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade düzeyindeki değişimlerin tespiti ile belirlenmiştir. MTT analizinde belirlenen dozlara göre nanopartikül uygulaması yapılan DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerine ait ifade değişimleri belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, *C. rangiformis* likeni ve *C. subulata* likeni elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması bütün konsantrasyonlarda *BCL-2* ve *CYP1A1* geni kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Böylelikle bütün konsantrasyonlarda daha çok eksprese olmuş ve uygulama sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini değiştirmiştir. Fakat gözlenen bu değişimin farklı hücre hatlarında yapılacak bir dizi çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Sayfa Adedi : 82

Anahtar Kelimeler : Liken, *Cladonia*, Nanopartikül, DLD-1, CCD18-Co, *BCL-2*, *CYP1A1*

Danışman : Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER EFFECTS AND MOLECULAR
BIOLOGICAL EVALUATION OF FLOWER-SHAPED HYBRID NANOSTRUCTURES
BIOSYNTHESIZED FROM DIFFERENT *Cladonia* (L.) LICHEN SPECIES

(M.Sc. Thesis)

Şeyda AKÇA

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

JUNE 2025

ABSTRACT

Nanoparticles are structures that have dimensions on the nanometer scale and, due to these properties, offer various possibilities for a number of industrial, medical and scientific applications. This makes it possible to compartmentalize nanoparticles in many areas such as drug development, planning techniques, catalysis, energy storage and sensor technologies. Biological synthesis of nanoparticles refers to the production of nanoparticles through the use of biological organisms or their components. This method offers an environmentally friendly and effective approach as an alternative to traditional chemical synthesis methods. Biological synthesis; It usually contains information about biological agents obtained from the extract of plants, herbs, lichens, fungi or other microorganisms. In particular, plant extracts and lichens ensure the existence of nanoparticles by reducing or precipitating the metal salts necessary for nanoparticle synthesis. This product; *Cladonia rangiformis* lichen analogue and *Cladonia subulata* lichen were used for the biological synthesis of copper-nano-flower composite component. The effects of the synthesized copper-nano-flower composite on cancer cells (DLD-1 colon cancer and CCD18-Co healthy colon system) were determined by monitoring the changes in the expression level of *CYP1A1* and *BCL-2* genes involved in the cancer pathway. Expression changes of *CYP1A1* and *BCL-2* genes were determined in the view of DLD-1 and CCD18-Co applied with nanoparticles according to the doses recorded in the MTT analysis. When the results were evaluated, the application of Cu-flower-shaped nanoparticles obtained from *C. rangiformis* lichen and *C. subulata* increased the *BCL-2* and *CYP1A1* gene groups at all concentrations compared to the control rates. In addition, the expression of *BCL-2* and *CYP1A1* genes, which were more expressed in all regions and are effective in unscheduled cell proliferation, which is seen in the risk of cancer, was changed due to the application. However, this observed change needs to be evaluated through a series of studies conducted on different cell lines.

Page Number : 82
Key Words : Lichen, *Cladonia*, Nanoparticle, DLD-1, CCD18-Co, *BCL-2*, *CYP1A1*
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışmada; *Cladonia subulata* ve *Cladonia rangiformis* liken türlerinden biyosentez yoluyla elde edilen Cu-çiçek şekilli hibrit nanopartiküller, özellikle kolon kanseri hücre hattı (DLD-1) ve sağlıklı kolon hücre hattı (CCD18-Co) üzerinde gösterdikleri biyolojik etkiler açısından değerlendirilmiştir. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, beni her konuda destekleyen değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI'na, yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda benden destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgilerini benimle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Ece AVULOĞLU YILMAZ'a, sağladıkları olanaklardan dolayı Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (AUMAULAB) ve tüm merkez çalışanlarına ve ayrıca eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ailem ve eşime sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nanoteknoloji.....	5
2.2. Nanopartikül.....	6
2.4. Nanopartikül Sentezi.....	9
2.5. Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Biyolojik Ajanlar.....	10
2.5.1. Mikroorganizmalar.....	11
2.5.2. Algler.....	12
2.5.3. Mantar ve likenler.....	12
2.6. Kanser.....	18
2.6.1. Kanserin genelleştirilmiş tanımı.....	19
2.7 Sitotoksosite ve MTT Testi.....	21
2.8. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi.....	25
2.8.1. Kolon kanseri risk faktörleri.....	26
2.9. Kanser Araştırmalarında Biyobelirteçler.....	27
2.9.1. Kanser biyobelirteçlerinin biyomoleküllere göre sınıflandırılması.....	30

2.9.2. Kanser araştırmalarında kullanılan genler.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	45
3.1. Nanomalzemelerin Sentezi.....	45
3.1.1. Nano-Malzemelerin sentezi için liken özütünün elde edilmesi.....	45
3.1.2. Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların sentezi.....	45
3.2. Nanomalzemelerin Karakterizasyonu.....	46
3.3 Hücre Kültürü ve MTT Testi.....	46
3.4. Moleküler Biyolojik Çalışmalar.....	47
3.4.1 Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	47
3.4.2 qRT-PCR analizleri.....	48
3.4.3 qPCR sonuçlarının normalizasyonu ve istatistiksel analizi.....	48
4. BULGULAR.....	50
4.1 Sentezi Yapılan Nanoyapıların Karakterizasyon Sonuçları.....	50
4.1.1 Fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) analiz sonuçları.....	50
4.1.2 Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) analiz sonuçları.....	52
4.2 MTT Analiz Sonuçları.....	53
4.2.1 <i>Cladonia subulata</i> 'dan elde edilen MTT sonuçları.....	54
4.2.2 <i>Cladonia rangiformis</i> 'den elde edilen MTT sonuçları.....	56
4.3 Moleküler Biyolojik Analiz Sonuçları.....	59
4.3.1 <i>Cladonia subulata</i> 'dan elde edilen gen ekspresyon verileri.....	60
4.3.2 <i>Cladonia rangiformis</i> 'den elde edilen gen ekspresyon verileri.....	63
5. TARTIŞMA.....	66
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Nanopartiküllerin kullanım alanları.....	9
Çizelge 3.1. Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların karakterizasyonda kullanılan analizler.....	46
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan genlere yönelik tasarlanan Real-Time PCR primer Dizileri.....	48
Çizelge 4.1. DLD-1 ve CCD18-Co Hücre Hatlarında Cu-Çiçek Şekli Nanopartikül Uygulamalarının MTT Sonuçları.....	54
Çizelge 4.2. DLD-1 ve CCD18-Co Hücre Hatlarında Cu-Çiçek Şekli Nanopartikül Uygulamalarının MTT Sonuçları.....	57
Çizelge 4.3. DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinin normalizasyonu sonucu elde edilen <i>CYP1A1</i> ve BCL-2 gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart sapması ve standart hatası.....	60
Çizelge 4.4. DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinin normalizasyonu sonucu elde edilen <i>CYP1A1</i> ve BCL-2 gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart sapması ve standart hatası.....	63

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Cladonia rangiformis</i>	13
Resim 2.2. <i>Cladonia subulata</i>	17



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1 Elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapılara ait karakterizasyon (FT-IR) sonuçları.....	51
Şekil 4.2 <i>Cladonia subulata</i> liken özütüyle biyolojik sentez yoluyla elde edilen bakır bazlı çiçek şekilli hibrit nanopartikülün FE-SEM görüntüsü	52
Şekil 4.3 <i>Cladonia rangiformis</i> liken özütüyle biyolojik sentez yoluyla elde edilen bakır bazlı çiçek şekilli hibrit nanopartikülün FE-SEM görüntüsü.....	53
Şekil 4.4 Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda kolon kanseri (DLD-1) hücrelerinin (5×10^3 hücre) absorbans verilerinin konsantrasyona bağlı değişimi.....	55
Şekil 4.5 Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda kolon kanseri (DLD-1) hücrelerinde (5×10^3 hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....	55
Şekil 4.6 Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücrelerinin (5×10^3 hücre) absorbans verilerinin konsantrasyona bağlı değişimi.....	56
Şekil 4.7 Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücrelerinde (5×10^3 hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi	56
Şekil 4.8 Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda kolon kanseri (DLD-1) hücrelerinin (5×10^3 hücre) absorbans verilerinin konsantrasyona bağlı değişimi.....	58
Şekil 4.9 Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda kolon kanseri (DLD-1) hücrelerinde (5×10^3 hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....	58
Şekil 4.10 Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücrelerinin (5×10^3 hücre) absorbans verilerinin konsantrasyona bağlı değişimi	59
Şekil 4.11 Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücrelerinde (5×10^3 hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....	59

Şekil 4.12 Belirlenen dozlarda <i>Cladonia subulata</i> likeninden elde edilen Cu-çiçek şeklindeki nanopartiküller ile tedavi edilen DLD-1 (kolon kanseri) hücre hatlarında <i>CYP1A1</i> ve <i>BCL-2</i> genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler.....	61
Şekil 4.13 Belirlenen dozlarda <i>Cladonia subulata</i> likeninden elde edilen Cu-çiçek şeklindeki nanopartiküller ile tedavi edilen CCD18-Co (sağlıklı normal kolon) hücre hatlarında <i>CYP1A1</i> ve <i>BCL-2</i> genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler.....	62
Şekil 4.14 <i>Cladonia rangiformis</i> likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması yapılmış DLD-1 (kolon kanseri) hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı <i>CYP1A1</i> ve <i>BCL-2</i> genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler.....	64
Şekil 4.15 <i>Cladonia rangiformis</i> likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması yapılmış CCD18-Co (sağlıklı normal hücre) hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı <i>CYP1A1</i> ve <i>BCL-2</i> genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
cm ²	Santimetre kare
dk	Dakika
g	Gram
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
ng/ml	Mililitre başına nanogram
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
A549	İnsan akciğer kanser epitel hücre hattı
Ag	Gümüş
AGS	İnsan mide karsinomu
AMJ-13	Meme kanseri hücresi

Simgeler	Açıklama
BrdU	Bromodeoksiüridin
CCD18-Co	Sağlıklı kolon hücresi
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CO ₂	Karbondioksit
COLO205	İnsan kolon kanseri hücre hattı
Ct	Cycle treshold
Cu	Bakır
CuO	Bakır oksit
DLD-1	Kolon kanseri hücresi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
EDX	Enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi
FESEM	Alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu
HCT	İnsan kolon kanseri hücre hattı
HEK293	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HT29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
IC50	% 50 baskılayıcı konsantrasyon
LOH	Heterozigotluk kaybı
miRNA	MikroRNA
MSI	Mikrosatellit instabilitesi
MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür testi

Simgeler	Açıklama
NCBI	National center for biotechnology information
NGS	Next-generation sequencing
NIH	National institutes of health
NP	Nanopartikül
PBS	Phosohate buffer saline
pH	Power of hydrogen
Pt	Platin
RNA	Ribonükleik asit
SKBR3	Meme kanseri hücresi
SKOV-3	Yumurtalık kanseri hücresi
SNP	Tek nükleotid polimorfizm
SW480	İnsan kolon kanseri hücre hattı

1. GİRİŞ

Kanser, insanların yaşam kalitesini bozan ve dünyada sıklıkla görülen ölümcül bir hastalıktır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte kanser gibi ölümcül genetik hastalıkların sayısı da artmaktadır. Genetik hasar, hücresel sistemin mekanizması değiştiğinde ya da toksik maddelere maruz kalındığında oluşabilir. Bunlara ek olarak sigara kullanımı, yetersiz miktarda sebze ve meyve içeren diyetler de kanser riskini artırır. Kanser metastaz yoluyla birlikte vücudun diğer organlarını sarabilir. Erken teşhislerde tedaviyle birlikte hayatta kalma süreleri arttırılabilir yani tedavinin başarılı olduğu bu sayede görülebilir (Esmeeta ve ark., 2022). Hızla gelişmekte olan teknoloji sayesinde kanser tanı ve tedavisinde olumlu sonuçlar görülmektedir.

1959 yılında Richard Feynman tarafından “Nanoteknoloji” kavramı ilk kez ortaya atılmıştır. 1974 yılında ise Norio Taniguchi tarafından isimlendirilmesi gerçekleştirilmiştir (Miyazawa ve ark., 2021). Nanoteknoloji çevre dostu olmakla birlikte biyoloji, fizik, malzeme mühendisliği, tıp, fizik gibi birçok disiplinler arası çalışmalara imkân sunan gün geçtikçe büyüyen önemli bir alandır (Fawzy ve ark., 2021). Nanoteknoloji, nano ölçekte geliştirilmiş fonksiyonel materyaller geliştirmek amacıyla biyoloji, fizik, tıp gibi disiplinlerle ilgilenen araştırmacıları bir araya getiren multidisipliner bir alandır. Bu sayede biyomedikal ve endüstriyel uygulamalar için nanomalzeme türlerinin sentezine olanak sağlamaktadır (Liao ve ark., 2019). Nanoteknoloji, yeni uygulamalara olanak sağlayan malzemelerin benzersiz özelliklerinin ortaya çıkardığı nano ölçekli maddelerin anlaşılmasını ve bu sayede de çeşitli nanopartiküllerin (NP’lerin) sentezinin gerçekleştirilmesi, karakterizasyonun yapılması ve uygulamaları ile yakından ilgilenen bir alandır.

NP’ler, 100 nm’den daha küçük partiküller olarak adlandırılmakla birlikte yüzey işlevselliklerine ve boyutlarına göre farklılık gösterirler. NP’lerin kozmetik ve tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılmaları geniş yüzey alanlarının olması ve küçük boyutlu olmalarından kaynaklıdır. Araştırmacıların dikkatini çekmelerinin asıl sebebi yüksek ısıya karşı dayanıklı olmaları ve buna ek olarak da geniş yüzey alanlarına sahip olmalarıdır. Gün geçtikçe NP’ler hakkında yapılan araştırmalar artmaktadır (Baran ve ark. 2018). Organik ve inorganik olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Organik olanlar karbon elementini içerirken inorganik olanlar altın gibi soy metal veya titanyum oksit gibi yarı

iletken elementleri içerir. NP'ler nanoteknolojinin yapı taşı olarak adlandırılmaktadır. NP'ler çeşitli biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Likenler, nanopartikül sentezinde önemli bir rol oynayan enzim ve proteinleri üreterek indirgeyici bir işlev görür. Bakterilere kıyasla daha yüksek biyokütle ve düşük maliyete sahip olmaları, mantarları nanopartikül üretimi için cazip bir seçenek haline getirmektedir. Likenler, genellikle mantarlarla simbiyotik bir ilişki içinde bulunan yosun ve mantar kombinasyonlarıdır. Bu organizmalar, çok çeşitli biyolojik bileşenlere sahiptir ve özellikle de sekonder metabolit bakımından oldukça zengindirler (Koca ve ark., 2020; Ata vd., 2024). Son yıllarda, likenlerin nanopartikül sentezi ve antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyeli araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu alanda çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Tarannum ve Gautam, 2019).

Liken özleri, düşük maliyet, yüksek stabilite, kolay erişim ve tek adımda işlem kolaylığı gibi özellikleriyle nanopartikül (NP) sentezi için giderek daha fazla ilgi görmektedir. Bu nitelikler, liken özlerini kimyasal ve fiziksel yöntemlere çevre dostu ve ekonomik bir alternatif olarak ön plana çıkarırken, sürdürülebilir nanoteknoloji uygulamaları için güçlü bir seçenek haline getirmektedir. Liken özlerinin içerdiği doğal bileşikler, metal iyonlarının biyolojik olarak indirgenmesinde ve üretilen nanopartiküllerin kararlılığının sağlanmasında kilit rol oynar. Bu özellikler, biyolojik sentez yöntemlerinin hem çevresel hem de ekonomik açıdan daha verimli bir süreç olarak öne çıkmasını sağlamaktadır (Mittal ve ark., 2013).

2. GENEL BİLGİLER

Nanoteknoloji, malzeme biliminde devrim yaratan bir alan olarak, biyolojik kaynaklı nanoyapıların geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu bağlamda, likenler; ikili organizmal yapıları ve zengin sekonder metabolit içerikleri sayesinde sürdürülebilir ve çevre dostu nanoyapı sentezi için dikkat çeken biyolojik kaynaklar arasında yer almaktadır. Likenlerden biyolojik sentez yoluyla elde edilen metal ve metal oksit nanopartiküller, antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktiviteler gibi çeşitli biyolojik özellikler sergilemekte olup, bu özellikler onları biyomedikal uygulamalarda potansiyel adaylar haline getirmektedir. Ayrıca, liken kökenli ekstraktların indirgeme ve stabilizasyon ajanı olarak görev alması, geleneksel kimyasal sentez yöntemlerine kıyasla daha az toksik ve daha kontrollü nanoparçacık üretimine olanak tanımaktadır. Dolayısıyla, liken bazlı nanoteknolojik yaklaşımlar, hem yeşil kimya ilkeleriyle uyumlu hem de sağlık ve çevre açısından daha güvenli alternatifler sunmaktadır.

2.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddenin atomik ve moleküler düzeyde manipüle edilerek yeni özelliklere sahip malzemeler, cihazlar ve sistemler elde edilmesiyle ilgilenen, disiplinler arası bir bilim ve mühendislik alanıdır. Bu alanın temel odak noktası, genellikle 1 ile 100 nanometre (nm) arasındaki boyutlarda yapıların tasarlanması, sentezlenmesi, karakterizasyonu ve uygulamaya yönelik optimizasyonudur (Bhushan, 2017). Bir nanometre, metrenin milyarda biridir, yani oldukça küçük ölçeklerde çalışılmaktadır. Bu ölçek düzeyinde malzemelerin yüzey alan/hacim oranı büyük ölçüde artar, kuantum etkiler belirginleşir ve buna bağlı olarak optik, manyetik, termal ya da mekanik özelliklerde önemli değişiklikler gözlenir.

Nanoteknolojinin yükselişi, 20. yüzyılın sonlarında taramalı tünelleme mikroskobu (STM) ile atomik boyutta görüntüleme imkânı ve elektron mikroskobunun gelişmiş versiyonlarıyla nanoyapıların detaylı incelenmesinin başlamasıyla hız kazanmıştır. Bu gelişmeler, malzemelerin yapı-özellik ilişkilerini anlamayı kolaylaştırmış, nanoölçekte tasarlanan yapılarla yeni fonksiyonel materyallerin üretilmesine zemin hazırlamıştır (Rosi ve Mirkin, 2005).

Nanoteknoloji birçok alanda devrim niteliğinde gelişmelere kapı aralamaktadır. Sağlık, ilaç taşınım sistemleri, hedefe yönelik kanser tedavileri, doku mühendisliği, enerji depolama, giyilebilir elektronikler, su arıtımı, gıda paketlenme, sensör sistemleri, katalizörler, inşaat malzemeleri ve çevre teknolojileri gibi çok geniş bir yelpazede etkin çözümler sunmaktadır (Chen ve ark., 2016). Örneğin, nanopartiküller aracılığıyla ilaç etkin maddelerinin hücre içine daha kontrollü ve hedefli taşınması sağlanabilir. Benzer şekilde, karbon nanotüpler ya da grafen gibi yapılar, elektronik cihazların boyutunu küçültürken performanslarını artırabilmektedir.

Ayrıca nanoteknolojinin gelişimi, sürdürülebilirlik ve çevre dostu yaklaşımlar için de büyük olanaklar sunar. Güneş pilleri, yakıt hücreleri, su filtrasyon membranları ya da kirleticileri ayrıştıran fotokatalitik nanopartiküller, çevre kirliliğinin azaltılmasından enerji verimliliğine kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Bununla birlikte, nanoteknolojinin hızla artan uygulamaları biyogüvenlik, toksisite ve etik sorunlarını da beraberinde getirebilir. Bu nedenle, nanomalzemelerin canlılar üzerindeki olası olumsuz etkilerinin anlaşılması, risk değerlendirmesi, düzenleyici standartların oluşturulması ve sürdürülebilir üretim süreçlerinin tasarlanması büyük önem taşımaktadır (Bhattacharya ve Guha, 2016).

2.2. Nanopartikül

Nanopartiküller, genellikle 1-100 nm boyut aralığında yer alan katı parçacıklardır ve nanoölçekte olmaları sayesinde makro ölçekli malzemelerden farklı özellikler sergilerler. Nanopartiküllerin kimyasal bileşimi, morfolojisi, yüzey kimyası ve boyutları, onların optik, manyetik, mekanik, elektriksel ve katalitik özelliklerini doğrudan etkiler (Rosi ve Mirkin, 2005). Bu nedenle, nanopartiküller malzeme bilimi, kimya, fizik, biyoloji, tıp, çevre ve mühendislik gibi birçok alanda ilgi odağı haline gelmiştir.

Nanopartiküller metalik, metal oksit, polimerik, seramik veya kompozit yapıda olabilir. Altın, gümüş, demir oksit, titanyum dioksit, silika ve polimer bazlı nanopartiküller en çok araştırılan ve kullanılan örneklerdendir. Özellikle altın nanopartiküller, yüzey plazmon rezonansı özelliği sayesinde optik sensörlerde, teşhis kitlerinde ve biyomedikal görüntülemelerde tercih edilmektedir (Bhushan, 2017). Demir oksit nanopartikülleri manyetik özellikleri ile hedefli ilaç taşınımı veya manyetik rezonans görüntülemelerde kontrast ajanı

olarak görev yapmaktadır. Polimerik nanopartiküller ise kontrollü salım sistemleri, ilaç kapsülleme ve doku mühendisliği uygulamaları için ideal bir matristir.

Nanopartiküllerin yüzey alanlarının büyüklüğü ve yüzey kimyası, diğer moleküllerle olan etkileşimlerini artırır. Bu durum, nanopartiküllerin yüzey modifikasyonuna olanak tanır ve istenilen fonksiyona yönelik kaplama, ligand bağlama veya biyomolekül ekleme işlemleri yapılabilir. Örneğin, bir nanopartikülün yüzeyine spesifik antikörler veya hedefleyici peptitler bağlanarak kanser hücrelerine seçici bir şekilde bağlanması sağlanabilir (Fernandes ve Hamdy, 2017). Bunun yanı sıra, nanopartiküllerin boyutları sadece birkaç nanometre ile sınırlı kalıp, kuantum boyut etkilerine maruz kaldıklarında elektronik ve optoelektronik özelliklerinde önemli değişiklikler yaşanır. Bu durum, yarıiletken kuantum noktalarının ışık yayma kapasitesini artırır ve biyogörüntüleme, aydınlatma, fotodinamik terapi gibi alanlarda kullanımını kolaylaştırır (Chan, 2010). Ancak nanopartiküllerin potansiyel yararlarının yanında sağlık ve çevre açısından bazı endişeler de ortaya çıkar. Nanopartiküllerin canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri, biyouyumluluk sorunları ve uzun vadeli maruziyetin sonuçları halen araştırılmaktadır. Bu nedenle, nanopartiküllerin üretimi, depolanması, taşınması ve bertarafı süreçlerinde güvenlik, standartlaştırma ve düzenleyici çerçevelerin oluşturulması önemlidir (Bhattacharya ve Guha, 2016).

Genel olarak, nanopartiküller boyut, şekil, yüzey kimyası ve bileşimlerine göre özelleştirilebilen, bu sayede çok çeşitli alanlarda kullanılabilen materyallerdir. Gelecekte, nanopartiküllerin daha fazla fonksiyonel hâle getirilmesi, üretim süreçlerinin çevre dostu yöntemlerle iyileştirilmesi ve güvenlik standartlarının geliştirilmesi ile bu alandaki uygulamaların hızla artması beklenmektedir.

2.3. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Nanopartiküller, sahip oldukları özgün fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sayesinde çok çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Bu alanlar, tıp ve farmasötikten elektronik ve enerjiye, gıda endüstrisinden çevre mühendisliğine kadar uzanmaktadır. Bu geniş kullanım yelpazesi, nanopartiküllerin fonksiyonel yüzey modifikasyonuna, kontrollü boyut ayarına ve çoklu özelliklerin bir arada sunulabilmesine dayanır (Bhushan, 2017).

Tıp ve eczacılık alanında, nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Özellikle hedefe yönelik ilaç iletim sistemleri, geleneksel tedavilere göre daha düşük yan etki ve daha yüksek etkinlik sunar. Örneğin, kanser tedavisinde tümör dokusuna spesifik ligandlarla kaplanan nanopartiküller, ilacın sadece hastalıklı hücrelere ulaşmasını sağlayarak sağlıklı dokuların zarar görmesini engeller. Benzer şekilde, gen terapisi uygulamalarında nükleik asitlerin hücre içine taşınmasında da nanopartiküller kullanılır (Chen ve ark., 2016).

Elektronik ve optoelektronik alanlarda, nanopartiküller transistörler, sensörler, güneş pilleri, LED'ler ve ekran teknolojilerinde kullanılmaktadır. Yarıiletken nanopartiküller veya kuantum noktaları, ışık emisyon ve iletim özelliklerini iyileştirerek enerji verimliliği yüksek, daha parlak ve daha uzun ömürlü cihazların üretilmesine imkân tanır (Rosi ve Mirkin, 2005).

Enerji ve çevre uygulamalarında, nanopartiküller kirleticilerin giderilmesi, atık su arıtımı, hava filtrasyonu, fotokatalitik reaksiyonlar, hidrojen üretimi ve enerji depolama teknolojilerinde rol oynar. Örneğin, titanyum dioksit nanopartikülleri güneş ışığı altında fotokataliz yaparak organik kirleticileri parçalayabilir (Bhattacharya ve Guha, 2016). Ayrıca, nanoölçekte gözeneklere sahip karbon bazlı malzemeler pillerin enerji depolama kapasitesini artırır ve yakıt hücrelerinin performansını yükseltir.

Gıda endüstrisinde, gıda paketlenme malzemelerine eklenen nanopartiküller, paketlemelerin bariyer özelliklerini artırabilir, gıdaların raf ömrünü uzatabilir ve antimikrobiyal etkinlik sağlayabilir. Tarım uygulamalarında ise nanopartikül gübreler veya ilaç formülasyonları, bitkisel ürünlerin verimliliğini artırırken çevresel yükü azaltabilir (Fernandes ve Hamdy, 2017).

Kozmetik sektöründe kullanılan titanyum dioksit veya çinko oksit nanopartikülleri, güneş kremlerinde ciltte beyaz iz bırakmadan UV koruması sunarken tekstil endüstrisinde nanopartiküller su itici, leke tutmaz veya antibakteriyel kumaşların elde edilmesine yardımcı olur. Ancak bu geniş kullanım potansiyeline rağmen, nanopartiküllerin yaygınlaşması güvenlik ve toksisite değerlendirmelerini de gerekli kılar. İnsan sağlığı ve çevre üzerindeki olası olumsuz etkilerinin önceden belirlenmesi, düzenleyici çerçevelerin oluşturulması ve risk yönetimi stratejilerinin geliştirilmesi önemlidir. Uygun güvenlik standartlarının

oluşturulması ve yeşil sentez yaklaşımlarının geliştirilmesiyle, nanopartiküllerin kullanım alanları gelecekte daha da genişleyecektir (Chan, 2010) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Nanopartiküllerin kullanım alanları (Denkbaş, 2015)

Sektör	Uygulama
Biyomühendislik, tıp ve sağlık	Kemik doku mühendisliği, Pansuman malzemeleri, Elektronik veri toplama aletleri, ilaç transferi, moleküler görüntüleme
Çevre ve enerji	Hava ve su arıtımı
Kozmetik	Güneş kremi, diş macunu
Tarım ve gıda	Nanogübre, tarım araçları
Tekstil	Yanmayan ve çarpmaya dayanıklı yüzeyler, suya dayanıklı kumaşlar

2.4. Nanopartikül Sentezi

Nanopartiküllerin istenilen özelliklerde elde edilebilmesi için sentez yöntemleri büyük önem taşır. Nanopartikül sentezi, genellikle iki ana yaklaşıma ayrılır: “top-down” (yukarıdan aşağıya) ve “bottom-up” (aşağıdan yukarıya) yöntemler (Bhushan, 2017). Top-down yöntemlerde, daha büyük parçacıkların fiziksel veya kimyasal işlemlerle nanometrik boyutlara indirgenmesi söz konusudur. Öğütme, lazer ablasyonu veya litografi bu yaklaşıma örnektir. Bottom-up yöntemlerde ise atomik veya moleküler seviyeden başlanarak kontrollü bir şekilde nanoyapılar inşa edilir. Kimyasal çöktürme, sol-jel prosesi, mikrodalga destekli sentez ve biyolojik sentez bu yaklaşımın örnekleridir.

Kimyasal sentez yöntemleri, metal tuzlarının uygun indirgeme ajanları ile reaksiyona sokulmasıyla metal nanopartiküllerin elde edilmesi gibi basit yaklaşımları içerir (Rosi ve Mirkin, 2005). Örneğin, altın nanopartiküller, HAuCl_4 'ün sodyum sitrat gibi bir indirgeme ajanıyla tepkimesi sonucu elde edilebilir. Bu yöntem, kontrollü partikül boyutu ve dar partikül boyut dağılımı sağlayarak, optik özelliklerin hassas bir şekilde ayarlanmasına imkân tanır.

Sol-jel metodu, metal alkoksitlerin hidroliz ve polimerizasyonu sonucunda metal oksit bazlı nanopartiküllerin elde edilmesinde kullanılır. Bu yöntem, özellikle silika, titanyum dioksit veya zirkonya gibi malzemelerin nanoyapılı formlarının üretilmesinde etkilidir (Fernandes ve Hamdy, 2017).

Fiziksel yöntemler arasında lazer ablasyonu, plazma sentezi ve püskürtme pirolizi gibi teknikler yer alır. Bu yöntemler, saf ve stabil nanopartiküllerin üretimini sağlarken genellikle daha pahalı ve kompleks ekipman gerektirir (Chan, 2010). Bununla birlikte, bu yaklaşımlar kirletici maddelerin kullanımını azaltarak daha “temiz” bir sentez imkânı sunabilir.

Son yıllarda biyolojik sentez yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Biyolojik sentez yöntemleri, çevre dostu ve enerji açısından verimli üretim süreçleri sunarak, metal nanopartiküllerin sürdürülebilir üretimine olanak tanır. (Koca ve ark., 2020; Ata ve ark., 2024). Mikroorganizmalar, algler, mantarlar, likenler ve bitkiler, metal tuzlarının nanometalik formlara indirgenmesinde katalizör rolü oynayarak biyouyumlu ve çevre dostu nanopartiküllerin elde edilmesini sağlar (Bhattacharya ve Guha, 2016). Biyolojik sentez, düşük sıcaklık ve basınç koşullarında, toksik kimyasallar kullanmadan, sürdürülebilir bir üretim zinciri oluşturmak açısından önemlidir.

Sentez sonrası, nanopartiküllerin morfoloji, boyut dağılımı, yüzey kimyası ve kristal yapısı gibi özelliklerinin karakterizasyonu da kritik bir adımdır. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), X-ışını kırınımı (XRD), dinamik ışık saçılımı (DLS) ve UV-görünür spektroskopi gibi teknikler ile nanopartiküllerin yapısal ve optik özellikleri analiz edilir (Chen ve ark., 2016).

2.5. Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Biyolojik Ajanlar

Nanopartikül sentezi son yıllarda giderek daha çevreci ve sürdürülebilir yöntemlere yönelmektedir. Bu bağlamda, biyolojik ajanlar (mikroorganizmalar, algler, mantarlar, likenler ve bitkiler) aracılığıyla nanopartiküllerin üretimi, geleneksel kimyasal veya fiziksel yöntemlere alternatif bir yaklaşım sunar. Biyolojik ajanlar, genellikle metal tuzlarını indirgeme ve stabilizasyon kabiliyetine sahip enzimler, proteinler, polisakkaritler ve diğer biyomoleküller içerir. Bu sayede, nanopartiküllerin boyut, şekil ve stabilite kontrolü daha

düşük enerjili, toksik kimyasal kullanımı olmadan ve sürdürülebilir koşullarda gerçekleştirilebilir (Bhattacharya ve Guha, 2016).

Biyolojik sentez, düşük sıcaklık ve basınç şartlarında, genellikle sulu çözeltilerde yapılır. Bu durum, enerji tüketimini azaltırken aynı zamanda çevreyi daha az kirletir. Ayrıca biyolojik kaynaklar, nanopartiküllerin yüzeyini kaplayarak doğal olarak biyoaktif bir kaplama sağlar. Bu kaplama, nanopartiküllerin biyoyumluluğunu artırarak, tıbbi uygulamalarda ve gıda ile temas eden malzemelerin üretiminde avantaj sağlayabilir (Fernandes ve Hamdy, 2017).

Aşağıdaki alt başlıklarda çeşitli biyolojik ajanların nanopartikül sentezindeki rolleri ve avantajları daha detaylı ele alınmaktadır.

2.5.1. Mikroorganizmalar

Bakteriler, mayalar ve bazı protozoalar, metal iyonlarını biyotransformasyona uğratarak nanopartiküllerin oluşumuna katkı sağlayabilir. Mikroorganizmalar, metabolizmaları sırasında salgıladıkları enzimler, proteinler ve diğer indirgeyici ajanlar sayesinde metal tuzlarını metalik nanopartiküllere dönüştürür. Örneğin, *Bacillus* ssp., *Pseudomonas* ssp. gibi bakteriler gümüş, altın veya demir bazlı nanopartiküllerin biyolojik sentezinde sıklıkla kullanılmıştır (Bhushan, 2017).

Mikroorganizmaların hücre duvarları, yüzey proteinleri ve polisakkarit yapıları nanopartiküllerin yüzeye tutunmasına veya partikül boyutunun stabilizasyonuna yardımcı olur. Ayrıca, mikroorganizmalar belirli koşullarda spesifik morfolojilerde nanopartikül üretimi yapabilir. Bu sayede hedeflenen uygulama için istenen partikül şekli ve boyutu elde etmek mümkün hale gelir (Rosi ve Mirkin, 2005).

Mikrobiyal sentez çevre dostu olmakla beraber, sürecin optimizasyonu için besiyeri bileşimi, sıcaklık, pH, reaksiyon süresi ve ışık gibi parametrelerin dikkatle kontrol edilmesi gerekir. Uygun koşullar sağlandığında, mikroorganizmalar büyük ölçekli üretimde ekonomik ve sürdürülebilir bir seçenek haline gelebilir.

2.5.2. Algler

Algler, fotosentetik mikroorganizmalardır ve metal iyonlarını toplama, biriktirme, dönüştürme kapasiteleriyle bilinir. Algler, metal iyonlarını hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplar aracılığıyla bağlayabilir ve daha sonra bu iyonları metal nanopartiküllerine dönüştürebilir (Fernandes ve Hamdy, 2017). Bu süreçte alg hücreleri, metal iyonlarının indirgenmesinde rol oynayan enzimler ve diğer biyomoleküller üretir.

Denizel veya tatlı su algleri, altın, gümüş, platin, paladyum, demir gibi farklı metallerin nanopartiküllerinin sentezinde kullanılabilmektedir. Alg bazlı sentez yöntemleri, düşük enerji tüketimi ve geri dönüştürülebilir biyokütle kullanımıyla öne çıkar. Ayrıca alglerin büyüme koşullarının laboratuvar ortamında kolayca ayarlanabilmesi, sürekli üretim için ölçeklendirme avantajı da sunar (Bhattacharya ve Guha, 2016).

Alglerle sentezlenen nanopartiküller, genellikle biyouyumlu ve stabil bir kaplama ile elde edilir. Bu, tıbbi görüntüleme, ilaç taşınımı, sensör teknolojileri veya çevresel uygulamalar gibi çok çeşitli alanlarda kullanılma potansiyeli sunar.

2.5.3. Mantar ve likenler

Mantarlar, metal iyonlarını indirgeme yetenekleriyle bilinen bir diğer biyolojik ajandır. Mantar hücreleri, metal iyonlarını hücre yüzeyinde tutabilir ve daha sonra enzimatik reaksiyonlar sayesinde metal nanopartiküllerini oluşturabilir. Bu süreçte mantarların ürettiği proteinler, polisakkaritler ve organik asitler, indirgeme ve stabilizasyon basamaklarında kritik rol oynar (Chen ve ark., 2016). Örneğin, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Rhizopus* gibi cinslerden mantarların, altın, gümüş ve diğer metal bazlı nanopartiküller üretmek için kullanıldığı bilinmektedir.

Likenler, algler ve mantarların simbiyotik birlikteliği sonucu oluşan kompleks organizmalardır. Likenlerin metabolik ürünleri, metal iyonlarının indirgenmesi ve nanopartikül stabilizasyonu için uygun bir mikroyapısal ortam sağlayabilir. Liken bazlı sentez yaklaşımları henüz nispeten yeni olsa da, bu organizmaların dayanıklılığı ve farklı iklim koşullarında yaşayabilme yetenekleri, kontrollü nanopartikül sentezi için gelecekte ilgi çekici bir platform sunmaktadır (Bhattacharya ve Guha, 2016).

Mantarlar ve likenler aracılığıyla yapılan sentez yöntemleri de çevre dostu ve ölçeklendirilebilir yaklaşımlardır. Bu sayede, sürdürülebilir ve düşük maliyetli nanomalzeme üretimi mümkün hale gelebilir. Ayrıca bu malzemelerin biyouyumlulukları, tıbbi uygulamalarda güvenli ve etkili çözümler üretme potansiyelini artırır.

2.5.3.1 *Cladonia rangiformis* (Hoffm.)

Cladonia cinsi, dünya genelinde yüzlerce türe sahip olmasıyla likenoloji araştırmalarında önemli bir yere sahip olup, farklı ekolojik koşullara uyum sağlayan geniş bir çeşitlilik sergiler (Ahti ve ark., 2013; Stenroos ve ark., 2002). Bu cinsin üyeleri, çoğunlukla karasal ekosistemlerde, toprak üstünde, çürüyen odun yüzeylerinde, kayalarda ve farklı bitki örtüsü tipleriyle ilişki halinde bulunabilmektedir. *Cladonia rangiformis* (Hoffm.) 'de özellikle ılıman ve Akdeniz iklim bölgelerinde yaygın görülen, karakteristik morfoloji ve kimyasal bileşimi ile dikkat çeken bir türdür (Purvis ve ark., 1992; Pinho ve ark., 2011).

C. rangiformis, frutikoza (çalımsı) bir yapıya sahip olan ve genellikle açık yeşil, grimsi ya da sarımsı-yeşil tonlar sergileyen bir türdür. Tipik olarak 2-5 cm yüksekliğe ulaşabilen podetiyaları, dallanmış ve geyik boynuzunu andıran karmaşık bir yapıda gelişir (Purvis ve ark., 1992). Podetiyalar, çoğunlukla ince, silindirik ve yan dallanmalara sahip olup, uç kısımları sıklıkla çatallaşır. Bu çatallaşma, türe karakteristik "geyiğe benzer" bir görünüm kazandırmakta ve morfolojik tanımlamada önemli bir kriter olarak öne çıkmaktadır (Wirth, 1995). Ayrıca yüzeydeki küçük pullar (skwamüller), likenin alt kısımlarında daha belirgin olup, üst kısımlarda genellikle daha az belirgindir (Resim 2.1).



Resim 2.1. *Cladonia rangiformis* (Hoffm.) (Çakar, 2009)

C. rangiformis'in anatomik yapısı, tipik bir likende olduğu gibi, fotobiyont (genellikle yeşil alg) ve mikobiyont (mantar) ortaklığına dayalıdır. Fotobiyont tabakası, dış kısımda yer alan ince bir korteks tabakasının hemen altında, mantar hifleriyle sıkı bir etkileşim halindedir. Bu simbiyotik ilişki, likenin çevresel stres koşullarında dayanıklılığını artırmakta ve türün farklı habitatlarda kolonileşmesini mümkün kılmaktadır (Smith ve ark., 2009).

Cladoniaceae familyasında yer alan *Cladonia rangiformis*, moleküler filogenetik çalışmalarla sistematik konumunu daha netleştiren türler arasındadır (Stenroos ve ark., 2002). Bu tür, *Cladonia* cinsi içerisinde “*Cladonia coccifera*” kompleksine yakın akrabalık gösteren bazı türlerle benzer morfolojik özellikler paylaşırsa da, DNA dizi analizleri sayesinde tür sınırları daha kesin olarak ortaya konulmaktadır (Ahti ve ark., 2013). Ayrıca filogenetik çalışmalar, farklı coğrafyalarda görülen popülasyonlar arasında genetik farklılıkların varlığını da ortaya koyarak, *C. rangiformis*'in ekolojik stratejileri ve adaptasyon mekanizmalarına ışık tutmaktadır.

Cladonia rangiformis, özellikle Avrupa'nın batı ve güney bölgelerinde (Akdeniz Havzası, Atlantik kıyıları) sıkça rastlanan bir türdür (Purvis ve ark., 1992). Bununla birlikte, türün dağılım alanı sadece Avrupa ile sınırlı kalmayıp, uygun mikroklimatik koşulların bulunduğu diğer ılıman kuşaklarda da gözlenebilir (Wirth, 1995). *C. rangiformis*; kuraklık, orta dereceli besin eksikliği ve ışık yoğunluğundaki değişimlere karşı belirli bir tolerans gösterir. Genellikle bazik topraklarda, kalkerli alanlarda ve çayır-benzeri habitatlarda yaygın olarak bulunur. Özellikle azot bakımından fakir alanlarda, bu türün varlığı, toprak stabilizasyonuna ve organik madde birikimine katkıda bulunarak ekosistemin bir bileşeni haline gelir (Ellis ve Coppins, 2006).

C. rangiformis, açık alanları, kıyı kayalıklarını, yarı-doğal çayırılıkları ve orman kenarlarını tercih etmekte, böylece farklı bitki toplumları içinde alt tabaka bileşeni olarak işlev görmektedir. Bunun yanı sıra, toprak erozyonunu yavaşlatarak bitki köklerinin tutunmasına zemin hazırlayan bir “ekosistem mühendisi” rolü üstlenir. Likenlerin yavaş büyümesi ve uzun ömürleri, alanın çevresel nitelikleri hakkında uzun vadeli bilgi sağlamakta, böylece *C. rangiformis* biomonitöring çalışmalarında da önemli hale gelmektedir (Pinho ve ark., 2011).

Cladonia rangiformis, karbonhidrat ve azot metabolizması açısından esnek bir yaklaşım sergileyerek, kurak dönemlerde su kaybını minimize eder ve su bulabildiği dönemlerde hızlı

bir fotosentetik aktivite gösterir (Asplund ve Gauslaa, 2007). Fizyolojik esneklik, likenin kuraklığa ve UV radyasyonuna maruz kaldığı ortamlarda hayatta kalmasını sağlar. Bu özellikler, *C. rangiformis*'i küresel iklim değişikliği ve arazi kullanım değişiklikleri gibi çevresel stres faktörlerine karşı potansiyel bir indikatör konumuna getirmektedir (Branquinho ve ark., 2015).

C. rangiformis, diğer *Cladonia* türleri gibi çeşitli likenik asitleri (örneğin usnik asit, atranorin, fumarprotocetrarik asit gibi depsit ve depsidon türevleri) bünyesinde barındırabilir (Culberson, 1972; Purvis ve ark., 1992). Bu ikincil metabolitler, hem ekolojik hem de farmakolojik açıdan önem taşımaktadır. Ekolojik yönden, otçullara karşı savunma, patojen mikroorganizmalara direnç ve UV ışınlarına karşı koruma gibi işlevler üstlenirler. Farmakolojik olarak bakıldığında, liken metabolitleri antimikrobiyal, antioksidan, antiviral ve antikanser potansiyel göstermeleriyle güncel araştırmaların odağında yer almaktadır (Boustie ve Grube, 2005).

C. rangiformis gibi yaygın türler, kontrollü ortam koşullarında izole edilebilecek biyoaktif bileşikler sunarak biyoteknolojik uygulamalara kaynak teşkil edebilir. Bu bağlamda, likenlerden elde edilebilecek sekonder metabolitlerin, ilaç keşfi ve geliştirilmesi sürecinde yeni moleküllerin tanımlanması için önemli bir potansiyel barındırdığı öne sürülmektedir (Lawrey, 2011).

Likenler, hava kirliliği ve ekosistem sağlığı hakkında bilgi sağlayan önemli biyomonitörlerdir. *C. rangiformis*, özellikle kükürt dioksit (SO₂) ve diğer atmosfik kirleticilere duyarlılığı veya toleransı ile ilgili çalışmalarda incelenerek, çevresel değişimlerin uzun vadeli etkileri hakkında bilgi verebilir (Pinho ve ark., 2011). Toprak özellikleri, azot birikimi, ağır metal kirliliği ve asitlenme gibi faktörlere tepki verebilen bu tür, arazi kullanım şekillerinin ekosistem fonksiyonlarına etkisini değerlendiren ekolojik çalışmalarda da kullanılmaktadır.

Moleküler düzeyde gerçekleştirilen çalışmalar, *C. rangiformis*'in genetik çeşitliliğini, popülasyon dinamiklerini ve filogenetik ilişkilerini aydınlatmakta kritik bir rol oynamaktadır. Son yıllarda, ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgeleri, mitokondriyal ve nükleer gen bölgeleri kullanılarak gerçekleştirilen DNA dizileme çalışmaları, türün genetik yapısı hakkında ayrıntılı bilgiler sağlamıştır (Stenroos ve ark., 2002). Bu bilgiler, türün

iklimsel değişikliklere tepkisini, farklı coğrafi bölgelerdeki popölasyonların uyarlanma stratejilerini ve gen akışını anlamak açısından önemlidir.

Cladonia rangiformis ve diğer *Cladonia* türleri, içerdii biyoaktif bileşikler nedeniyle farmakoloji, kozmetik, gıda koruyucuları ve biyomateryal üretimi alanlarında potansiyel kaynaklar sunmaktadır (Lawrey, 2011; Boustie ve Grube, 2005). Likenik asitlerin antifungal, antibakteriyel ve sitotoksik özellikleri, yeni ilaç adaylarının araştırılması için ilgi çekici bir alan oluşturmaktadır. Ayrıca likenlerden elde edilen bazı metabolitler, nanoteknoloji ve malzeme bilimi alanlarında hibrit nano-yapıların sentezi ve fonksiyonelleştirilmesi için kullanılabilir. Bu bağlamda, *C. rangiformis*'in geniş ekolojik yayılımı, kolay ulaşılabilirliği ve kimyasal çeşitliliği, biyoteknolojik uygulamaları destekleyen bir alt yapı sunar.

Cladonia rangiformis, morfolojik, ekolojik, kimyasal ve genetik özellikleri bakımından iyi incelenmiş liken türlerinden biridir. Bu tür, ılıman ve Akdeniz ekosistemlerinde sıklıkla karşılaşılan, toprak stabilizasyonuna katkı sağlayan ve biyoindikatör işlevi gören bir organizmadır. Özellikle içerdii ikincil metabolitlerin biyoaktif özellikleri, *C. rangiformis*'i farmasötik, kozmetik ve biyoteknoloji alanlarında potansiyel bir kaynak olarak ön plana çıkarmaktadır.

2.5.3.2 *Cladonia subulata* (L.) F.H. Wigg.

Cladonia cinsi, dünya genelinde kozmopolit dağılıma sahip, özellikle tundra, boreal ormanlar, ılıman iklim kuşakları ve dağlık bölgelerde yaygın olarak görülen likenlerden oluşmaktadır (Ahti ve ark., 2013). *Cladonia* alt cinsleri ve türleri morfolojik, kimyasal ve ekolojik özelliklerinin çeşitliliği ile dikkat çeker. Bu cins içinde yer alan *Cladonia subulata* (L.) F.H. Wigg. ise geniş ekolojik toleransı, çarpıcı morfolojik özellikleri ve metabolit profili ile öne çıkmaktadır (Brodo ve ark., 2001; Ahti ve ark., 2013).

C. subulata; tipik olarak grimsi-yeşil renk tonuna sahip, dikensi ya da çomak şeklinde podetiyalar oluşturan, bazen küçük, dallanmış yapı gösterebilen, genellikle 1-3 cm yüksekliğe ulaşan bir liken türüdür. Podetiyaların yüzeyi bazen ince pullarla (skwamul) kaplı olabilmekte ve üst kısımlarında kahverengimsi apotesyalar (üreme yapılarını taşıyan disk benzeri yapılar) bulunabilmektedir (Ahti ve ark., 2013; Brodo ve ark., 2001). Morfolojik

farklılıklar ve varyasyonlar iklim, toprak tipi, nem düzeyi ve ışık koşulları gibi çevresel faktörlere bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (Purvis, 2000).

Sistematik olarak Cladoniaceae familyasının bir üyesi olan *C. subulata*, filogenetik düzeyde diğer *Cladonia* türleri ile yakın akrabalık ilişkileri gösterir. Kladistik ve moleküler filogenetik çalışmalar, cins içi tür sınırlarının belirlenmesinde hem morfolojik hem de kimyasal karakterlerin yanı sıra DNA dizilim analizlerinin de önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Ahti ve ark., 2013).

C. subulata geniş bir coğrafi dağılıma sahip olup Kuzey Yarımküre'nin boreal ve ılıman bölgelerinde sıkça gözlenmektedir (Brodo ve ark., 2001). Özellikle açık alanlarda, asidik topraklarda, bozkırlarda, nemli orman tabanlarında ve bazen de kurak alanlarda bile yaşayabilmektedir. Bu geniş ekolojik tolerans, türün farklı mikrohabitatlarda kolonileşme yeteneğini artırır (Ellis ve Coppins, 2006). *C. subulata* ayrıca toprak stabilizasyonuna ve habitat mühendisliğine katkıda bulunarak diğer bitki ve liken türlerinin yerleşiminde rol oynar (Purvis, 2000) (Resim 2.2).



Resim 2.2. *Cladonia subulata* (L.) F.H. Wigg. (Nash ve ark., 2002)

Cladonia türleri, likenik asitler olarak bilinen bir dizi ikincil metaboliti sentezler. *C. subulata* da diğer birçok *Cladonia* türü gibi usnik asit, fumarprotocetrarik asit ve diğer depsit/depsidon türevlerini içerebilir (Culberson, 1972; Asplund ve Gauslaa, 2007). Bu metabolitler, otçullara ve mikroorganizmalara karşı savunma, UV radyasyonuna karşı koruma, antioksidan ve antibakteriyel gibi birçok ekolojik işlev üstlenmektedir. Son yıllarda,

liken sekonder metabolitlerinin antimikrobiyal, antiviral ve antikanser potansiyelleri de araştırma konusu haline gelmiştir (Asplund ve Gauslaa, 2007).

C. subulata'nın kimyasal kompozisyonu ve bu kompozisyonun çevresel koşullara göre değişimi, türün hem ekolojik rolünün hem de potansiyel farmakolojik özelliklerinin anlaşılmasında önemlidir. Bu nedenle, *C. subulata* başta olmak üzere *Cladonia* cinsi üyelerinin ikincil metabolit profillerinin belirlenmesi, biyoaktif bileşiklerin keşfi ve sürdürülebilir biyoteknolojik uygulamalar açısından araştırmacılara önemli avantajlar sunmaktadır.

Cladonia subulata gerek ekolojik uyumluluğu, gerek yüksek kimyasal çeşitliliği nedeniyle likenolojide önemli bir model organizma konumundadır. Türün farklı habitat ve koşullarda gösterdiği morfolojik ve kimyasal varyasyonlar, biyoaktif bileşik üretimi ve ekolojik rollerinin araştırılmasında kritik bir öneme sahiptir.

2.6. Kanser

Kanser tedavisinde hedefe yönelik ve biyouyumlu yaklaşımlara duyulan ihtiyaç, nanoteknoloji tabanlı çözümlerin önemini artırmıştır. Son yıllarda, çevre dostu ve sürdürülebilir nanoparçacık üretimi için biyolojik kaynakların kullanımı ön plana çıkarken, likenler bu alanda dikkat çeken organizmalar arasında yer almaktadır. Likenler, sahip oldukları zengin fenolik bileşikler ve sekonder metabolitler sayesinde metal iyonlarını indirgeme ve nanoparçacık stabilizasyonu sağlayabilme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleriyle, likenlerden yeşil sentez yoluyla elde edilen metal veya metal oksit bazlı nanoparçacıklar, sitotoksik etkileri ve hücre seçicilikleri nedeniyle kanser hücrelerinin hedeflenmesinde potansiyel taşıyan biyoaktif ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca bu hibrit nanoyapılar, geleneksel kemoterapötik ajanlara göre daha düşük yan etki profili ve artırılmış terapötik etkinlik gibi avantajlar sunarak, kanser tedavisinde yenilikçi ve etkili bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır.

2.6.1. Kanserin genelleştirilmiş tanımı

Kanser, çok çeşitli genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu meydana gelen, hücrelerin normal kontrol mekanizmalarından koparak çoğalma, farklılaşma ve ölüm dengelerini yitirdiği, kompleks bir hastalıklar bütünüdür (Hanahan ve Weinberg, 2011; Vogelstein ve Kinzler, 2004). Bu durum, tek bir hastalık olmaktan ziyade, farklı dokular ve hücre tiplerinde ortaya çıkan yüzlerce alt tipe sahip, heterojen ve dinamik bir sürecin ürünüdür (Stratton ve ark., 2009; Garraway ve Lander, 2013).

Normal hücreler, büyümelerini, bölünmelerini ve yaşam döngülerini belirli genetik programlar ve dâhili kontrol noktaları aracılığıyla düzenler (Weinberg, 2007). Hücre siklusu denetleyicileri, DNA tamir mekanizmaları, apoptoz (programlı hücre ölümü) sinyal yolları ve doku mimarisini düzenleyen hücre-hücre etkileşimleri sağlıklı dokunun sürekliliğini sağlar (Evan ve Vousden, 2001; Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanserde ise bu düzenleyici ağlar bozulur. Hücreler, proliferatif sinyallerin kontrolsüz bir şekilde aktif kalması, büyümeyi baskılayan sinyal yollarının devre dışı kalması, apoptozun engellenmesi, doku bütünlüğünün yok olması ve anjiyogenez gibi süreçlerin kontrol dışına çıkmasıyla karakterize edilen, “ölümsüzleşmiş” bir fenotip edinir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Vogelstein ve ark., 2013).

Kanserin temelini oluşturan kritik nokta, hücrenin genetik materyalinde meydana gelen istikrarlı değişimlerdir. Onkogen aktivasyonları, tümör baskılayıcı genlerin kaybı ya da inaktivasyonu, DNA tamir genlerindeki mutasyonlar, kromozomal yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonları ve delesyonları tümör gelişimine katkıda bulunur (Vogelstein ve Kinzler, 2004; Alexandrov ve ark., 2013). Bu genetik olaylara ek olarak, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve küçük RNA’lar gibi epigenetik mekanizmalar gen ifadesini yeniden programlayarak kanser hücresinin fenotipinin oluşmasında rol oynar (Baylin ve Jones, 2011; Sharma ve ark., 2010).

Kanser, tek bir “kusurlu” hücrenin klonal çoğalmasından kaynaklansa da tümör dokusu zamanla genetik ve fenotipik açıdan son derece heterojen bir hücre topluluğuna dönüşür (Marusyk ve ark., 2012). Bu heterojenite, farklı tümör alt popülasyonlarının oluşmasına, tedavi direncine, metastatik potansiyele ve klinik seyrin öngörülmesindeki zorluklara neden olur. Dahası, kanser hücrelerinin sürekli mutasyon biriktirmesi, darwinci bir seçim süreci

yaratarak daha agresif, tedaviye dirençli alt klonların evrimleşmesine yol açar (Greaves ve Maley, 2012).

Kanser, yalnızca hücrenin kendisiyle sınırlı olmayan bir ekosistemdir. Tümör hücreleri, bağ doku hücreleri (fibroblastlar), endotel hücreler, immün hücreler, perisitler ve ekstrasellüler matriks bileşenleri ile etkileşime girer (Hanahan ve Coussens, 2012). Bu tümör mikroçevresi, tümör büyümesini destekleyici sinyaller sağlayabilir, immün sistemin tümöre karşı yanıtını baskılayabilir ve metastaz için uygun ortam hazırlayabilir (Joyce ve Pollard, 2009). Anjiyogenez, yani yeni kan damarlarının oluşumu, tümörün oksijen ve besin kaynağını garanti altına alarak büyüme destekler (Carmeliet ve Jain, 2000).

Kanserin en ölümcül özelliği, primer tümörden kopan kanser hücrelerinin kan, lenf veya vücut boşlukları yoluyla yayılıp uzak organlarda yeni tümör kolonileri (metastazlar) oluşturmasıdır (Steeg, 2006). Bu süreç, tümör hücrelerinin epitel-mezenkimal geçiş (EMT), hücre iskeleti yeniden düzenlenmeleri, proteolitik enzimlerin salınımı, immün kaçış stratejileri gibi bir dizi adaptasyonuyla mümkün hale gelir (Nieto ve ark., 2016; Fidler, 2003). Metastaz, kanserin tedavisini güçleştirir ve hastanın yaşam beklentisini drastik biçimde azaltır.

Normal koşullarda, immün sistem anormal hücreleri tanımaya ve ortadan kaldırmaya yönelik mekanizmalara sahiptir (Schreiber ve ark., 2011). Ancak kanser, immün denetimi aşmak için çeşitli stratejiler geliştirir. Programlı hücre ölüm ligand-1 (PD-L1) gibi inhibitör moleküllerin eksprese edilmesi, tümör antijen sunumunun bozulması, immün baskılayıcı hücrelerin (regülatör T hücreleri, M2 makrofajlar) tümör bölgesinde birikmesi immün kaçışı kolaylaştırır (Joyce ve Pollard, 2009). Bu olgu, immünoterapi yaklaşımlarının (ör. PD-1/PD-L1, CTLA-4 inhibitörleri) geliştirilmesiyle kanser tedavisinde devrim niteliğinde ilerlemelere yol açmıştır (Topalian ve ark., 2012).

Kanserin ortaya çıkışında genetik yatkınlık önemli olmakla birlikte, çevresel faktörler ve yaşam tarzı da belirleyici rol oynar. Tütün kullanımı, sağlıksız beslenme, obezite, fiziksel inaktivite, kronik inflamasyon, viral enfeksiyonlar (HPV, HBV, HCV), kimyasal karsinojenler, radyasyon ve hava kirliliği gibi etkenler kanser riskini artırır (Anand ve ark., 2008; Lichtenstein ve ark., 2000). Bu faktörlerin genetik mutasyonlar oluşturma, epigenetik

değişiklikleri tetikleme ve immün dengeyi bozma potansiyelleri, kanser gelişimine zemin hazırlar.

Kanser tanısı için histopatolojik incelemeler, tıbbi görüntüleme, biyomarker testleri, moleküler profillemeye gibi yöntemler kullanılır (Henry ve Hayes, 2012). Genetik ve moleküler biyobelirteçlerin tanımlanması, tümör alt tiplerinin belirlenmesinde ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik önem taşır (Liotta ve Petricoin, 2010). Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedaviler, immünoterapi, hormon tedavileri ve gen tedavileri gibi çok çeşitli tedavi yaklaşımları tek başına veya kombinasyonlar halinde kullanılabilir (Chabner ve Roberts Jr, 2005; Vogelstein ve ark., 2013).

Her ne kadar kanser tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilse de tedaviye yanıt, ilaç direnci, kanser nüksü, metastaz ve yan etkiler gibi zorluklar nedeniyle hastaların uzun dönem sağkalımını artırma çabaları devam etmektedir (Garraway ve Lander, 2013). Çok boyutlu tedavi stratejileri, bireyselleştirilmiş tıp yaklaşımları ve yapay zekâ destekli tanı-tedavi sistemleri gibi alanlar hızla gelişmektedir.

2.7 Sitotoksosite ve MTT Testi

Sitotoksosite, bir kimyasal maddenin, biyolojik etkenin veya fiziksel koşulun hücreler üzerinde neden olduğu yapısal veya fonksiyonel hasar ile ilgili bir kavramdır (Elliott ve Yuan, 2011; Fotakis ve Timbrell, 2006). Hücrelerde proliferasyon hızının azalması, hücre metabolizmasının bozulması, organel yapılarının hasar görmesi veya hücre ölümünün tetiklenmesi gibi süreçler sitotoksik etkiler kapsamında değerlendirilir (Riss ve ark., 2013). Sitotoksosite testleri, ilaç geliştirme, biyomedikal araştırmalar, toksikoloji, nanoteknoloji ve çevre bilimleri gibi geniş bir alanda kullanılmakta, biyolojik sistemlerin dış etkenlere verdiği yanıtın anlaşılmasında kritik bir rol oynamaktadır (Bopp ve Lettieri, 2008; Bölükbaşı ve ark., 2023).

Günümüzde sitotoksosite testleri, hem akademik hem de endüstriyel araştırma laboratuvarlarında rutin olarak uygulanmaktadır. Bu testler, yeni ilaç moleküllerinin güvenlik profilinin belirlenmesinde, kanser kemoterapisinde kullanılan bileşiklerin hücre üzerinde oluşturduğu etkilerin değerlendirilmesinde, hücre kültürü sistemlerinin optimizasyonunda, gen terapisi stratejilerinin test edilmesinde ve çevresel toksinlerin

biyolojik etkilerinin incelenmesinde yaygın şekilde kullanılır (Riss ve ark., 2013; Bass ve ark., 2009).

Sitotoksositeyi değerlendirmek için çeşitli biyokimyasal, moleküler ve hücre temelli testler geliştirilmiştir. Hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücre ölüm oranları, membran bütünlüğü, metabolik aktivite, apoptotik veya nekrotik göstergeler, hücre morfolojisi ve spesifik biyomoleküllerin salınım profili gibi parametreler üzerinden sitotoksik etki ölçülebilmektedir (Fotakis ve Timbrell, 2006; Van Tonder ve ark., 2015).

Bunlardan bazıları şunlardır:

1. Hücre Canlılık Testleri: Hücre metabolik aktivitesini veya membran bütünlüğünü ölçerek canlı hücre sayısını belirleyen testlerdir. Örneğin, MTT, XTT, WST-1 gibi tetrazolium bazlı testler metabolik aktiviteyi ölçerken, Trypan Blue boyama testi hücre membran bütünlüğüne dayanır (Mosmann, 1983; Berridge ve ark., 2005).
2. Apoptoz ve Nekroz Testleri: Annexin V-FITC ile fosfatidilserin pozisyonunun incelenmesi veya propidyum iyodür (PI) boyaması, hücrelerin ölümü ile ilgili mekanizmaların (apoptoz, nekroz) anlaşılmasında kullanılır (Vermes ve ark., 2000).
3. Hücre Proliferasyonu Ölçümleri: BrdU (Bromodeoksiüridin) eklenmesi veya Ki-67 boyamasıyla hücre döngüsü aşamaları ve çoğalma hızı değerlendirilebilir (Hofland ve Pollak, 2010).
4. Laktat Dehidrojenaz (LDH) Testi: Hücre bütünlüğünün bozulması sonucu hücre dışına salınan LDH enziminin miktarı, hücre hasarı ve sitotoksosite düzeyini gösterir (Decker ve Lohmann-Matthes, 1988).

Bu testler arasında MTT testi, hücre canlılığını ve metabolik aktiviteyi basit, güvenilir ve hızlı bir şekilde ölçtüğü için en yaygın kullanılan sitotoksosite değerlendirme yöntemlerinden biridir (Mosmann, 1983; Riss ve ark., 2013).

MTT (3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi, hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitelerine dayalı bir sitotoksosite ve hücre canlılık

değerlendirme yöntemidir (Mosmann, 1983; Berridge ve ark., 2005). Mitokondrilerdeki NAD(P)H-bağımlı oksidoredüktazlar tarafından MTT'nin suda çözünür sarı tetrazolyum tuzu formundan suda çözünmeyen mor formazan kristallerine dönüştürülmesi testin temelini oluşturur. Canlı hücrelerde enerji metabolizması aktif olduğundan MTT'den formazan oluşumu yüksek olurken, ölü veya metabolik olarak inaktif hücrelerde bu dönüşüm gerçekleşmez (Denizot ve Lang, 1986).

MTT testi genellikle şu adımlarla gerçekleştirilir (Riss ve ark., 2013):

1. Hücre Kültürü: Test edilecek hücreler (örneğin kanser hücre hatları, primer hücreler) uygun besiyerinde ve inkübatör koşullarında (37°C, % 5 CO₂) çoğaltılır.
2. Plak Hazırlığı: Hücreler, genellikle 96 kuyucuklu plaklara belirli bir yoğunlukta ekilir. Böylece her kuyucuk bir deney birimi haline gelir.
3. Uygulama Maddesi: Test edilmek istenen kimyasal, ilaç, nanoparçacık, peptit veya gen terapisinde kullanılan vektör gibi etken madde uygun konsantrasyonlarda hücrelere eklenir. Deney süresi genellikle 24-72 saat arasında değişebilir (Fotakis ve Timbrell, 2006).
4. MTT Eklenmesi: İnkubasyon süresinin sonunda her kuyucuğa MTT çözeltisi eklenir. Hücreler bir süre daha inkübe edilerek (genellikle 3-4 saat) MTT'nin formazana dönüşmesine izin verilir.
5. Formazan Çözülmesi: Oluşan mor formazan kristalleri, genellikle DMSO veya izopropanol gibi organik çözücülerle çözülerek homojen bir renkli çözelti elde edilir.
6. Absorbans Ölçümü: Mikroplaka okuyucusunda 540-570 nm dalga boyunda formazan çözeltilerinin optik yoğunluğu (OD) ölçülür. Elde edilen absorbans değeri, hücre canlılığının ve dolayısıyla test edilen maddenin sitotoksik etkisinin nicel bir ölçüsü olarak kullanılır (Berridge ve ark., 2005).

MTT testi sonuçları, kontrol grupları ve farklı konsantrasyonlardaki test maddeleri arasındaki absorbans farklarına dayanarak hesaplanır (Riss ve ark., 2013). Kontrollere göre

azalan OD değeri, canlı hücre sayısının azalması ve sitotoksitenin artması anlamına gelir. Genellikle IC50 (yarı maksimal inhibitör konsantrasyon) değeri belirlenir; bu değer, test maddesinin hücre canlılığını % 50 azaltan konsantrasyonunu ifade eder. Bu sayede test edilen maddenin hücreler üzerindeki sitotoksik potansiyeli karşılaştırılabilir ve kantitatif bir şekilde değerlendirilmiş olur (Fotakis ve Timbrell, 2006).

MTT testi, basitliği, duyarlılığı, hızlı sonuç vermesi ve düşük maliyeti nedeniyle oldukça popülerdir. Küçük örnek hacimlerinde bile uygulanabilir olması, yüksek örneklem sayısı ile paralel test imkânı sunması, sonuçların kolayca niceliksel hale getirilebilmesi gibi avantajları mevcuttur (Berridge ve ark., 2005). Ayrıca MTT testi, hücre metabolizmasının sağlıklı işlediği bir dönemde uygulanırsa hücre canlılığına iyi bir gösterge olarak kabul edilebilir.

Bununla birlikte, MTT testinin bazı kısıtlılıkları da vardır. Test, hücre metabolizmasındaki değişikliklere duyarlı olduğu için, metabolik süreçlerdeki farklılıklar veya test maddesinin enzimatik aktiviteye etkileri sonuçları etkileyebilir (Riss ve ark., 2013). Bazı hücre tipleri, MTT'den formazan oluşumunu azaltan veya değiştiren metabolik yollara sahip olabilir. Ek olarak, MTT testi ölmekte olan ancak henüz metabolik aktivitesini tamamen yitirmemiş hücrelerle ölmüş hücreleri net olarak ayırt edemeyebilir. Bu nedenle MTT testi çoğu zaman ek testlerle (LDH testi, Annexin V boyaması, mikroskopik inceleme) desteklenmelidir (Van Tonder ve ark., 2015).

MTT testi, ilaç keşfinde kurşun bileşiklerin sitotoksik profilinin belirlenmesinde, mevcut kemoterapötik ilaçların hücre direncini aşmak için kombinasyon çalışmalarında, gen terapisinde kullanılan viral ve non-viral vektörlerin hücre canlılığına etkilerinin incelenmesinde kullanılır (Denizot ve Lang, 1986; Bass ve ark., 2009). Ayrıca, kozmetik ve gıda endüstrisi, çevresel toksikoloji, nanotoksikoloji, hücresel immünoloji araştırmaları gibi alanlarda da MTT testi yaygın olarak uygulanmaktadır (Bopp ve Lettieri, 2008).

Sitotoksite testleri, hücrelerin dış etkenlere karşı nasıl tepki verdiğini anlamak için temel araçlardır. MTT testi, bu amaçla en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Gelişen teknoloji ve yüksek verimli tarama (high-throughput screening) yaklaşımları, MTT testinin robotik otomasyon sistemleriyle birleştirilmesine ve yüzlerce hatta binlerce örneğin aynı anda analiz edilmesine imkân tanımaktadır (Riss ve ark., 2013).

2.8. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi

Kolon kanseri, dünya genelinde en yaygın görülen malign neoplazmlardan biridir. Özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde insidansı yüksek olan bu kanser türü, hem erkekler hem de kadınlar arasında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir (Ferlay ve ark., 2019). Kolon kanserinin küresel dağılımında, beslenme alışkanlıkları, yaşam tarzı, sosyoekonomik koşullar, genetik yatkınlık ve sağlık hizmetlerine erişim gibi bir dizi faktör belirleyici rol oynar.

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, kolorektal kanser (kolon ve rektum kanserlerini birlikte kapsar) kansere bağlı ölümler sıralamasında üst sıralarda yer almakta, özellikle 50 yaşın üzerindeki popülasyonlarda giderek artan bir insidans göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde artan yaşam beklentisi, değişen beslenme alışkanlıkları, kırmızı et, işlenmiş et ürünleri ve yüksek yağ içerikli diyet tüketiminin artması, sedanter yaşam biçimi ve obezite gibi faktörler kolon kanseri riskini önemli ölçüde yükseltmektedir. Ayrıca son yıllarda, gelişmekte olan ülkelerde de sanayileşme, kentleşme, batı tarzı beslenme modellerinin benimsenmesiyle kolon kanseri insidansının yükseldiği gözlenmektedir (Bray ve ark., 2018).

Coğrafi dağılıma bakıldığında, Kuzey Amerika, Avrupa'nın batı ve kuzey bölgeleri, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi yüksek gelirli bölgelerde kolon kanseri insidansı oldukça yüksektir. Asya, Afrika ve Güney Amerika'nın bazı bölgelerinde ise insidans daha düşüktür; ancak bu bölgeler de hızla değişen yaşam tarzları ve beslenme alışkanlıkları nedeniyle artan bir eğilim göstermektedir. Yaş, kolon kanseri epidemiyolojisinde önemli bir etkidir. Genellikle 50 yaş ve üzeri bireylerde daha sık görülmekle birlikte, son dönemlerde genç yetişkinlerde de kolorektal kanser insidansında bir artış gözlenmektedir. Bu eğilim, genetik faktörler, obezite, çevresel maruziyetler ve muhtemelen mikrobiyota değişiklikleriyle ilişkili olabilir. Cinsiyet açısından bakıldığında, kolon kanseri insidansı erkeklerde kadınlara göre biraz daha yüksektir; ancak bu fark nispeten küçüktür (Arnold ve ark., 2017).

Tarama programlarının yaygınlaşması, kolon kanserinin erken evrede tespitini artırarak mortaliteyi azaltmaktadır. Fekal gizli kan testi, kolonoskopi, sigmoidoskopi ve diğer tarama yöntemlerinin düzenli olarak uygulanması, yüksek risk altındaki gruplarda erken tanıyı kolaylaştırır. Erken tanı, daha etkili tedavi ve iyileşme şansını yükseltmektedir (US Preventive Services Task Force, 2021).

2.8.1. Kolon kanseri risk faktörleri

Kolon kanseri, genetik altyapı, çevresel maruziyetler ve yaşam tarzı faktörlerinin karmaşık bir etkileşimi sonucunda ortaya çıkar. Bu kanser türünün risk faktörleri, değiştirilebilir ve değiştirilemez olmak üzere iki ana kategori altında incelenebilir (Dekker ve ark., 2019). Değiştirilemez faktörler arasında yaş, aile öyküsü, genetik sendromlar (örneğin, ailesel adenomatöz polipozis, Lynch sendromu) ve kişisel tıbbi geçmiş sayılabilir. Değiştirilebilir faktörler ise beslenme, fiziksel aktivite, vücut ağırlığı, sigara, alkol tüketimi ve bazı ilaçların uzun süreli kullanımı gibi unsurları içerir.

Yaş, kolon kanseri riskini artıran en belirgin faktördür. Genellikle 50 yaşın üzerinde insidans artarken, erken yaşlarda kolon kanseri nadir görülür. Bununla birlikte, son dönemlerde genç yetişkinlerde de kolon kanseri sıklığında bir artış rapor edilmektedir. Bu durum, obezite, sedanter yaşam tarzı, işlenmiş gıda tüketimi ve bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerle ilişkili olabilir (Arnold ve ark., 2017).

Aile öyküsü ve genetik yatkınlık, önemli risk faktörleridir. Birinci derece akrabalarında (ebeveyn, kardeş) kolon kanseri görülen bireylerin riski artar. Lynch sendromu (herediter nonpolipozis kolorektal kanser, HNPCC) gibi genetik sendromlar, DNA onarım genlerindeki mutasyonlar nedeniyle erken yaşta kolorektal kanser gelişme olasılığını yükseltir. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) gibi sendromlarda ise kolon mukozasında yüzlerce hatta binlerce polip oluşumu gözlenir; bu poliplerin zamanla kansere dönüşme riski çok yüksektir (Dekker ve ark., 2019).

Beslenme alışkanlıkları, kolon kanseri riskinde kritik rol oynar. Yüksek oranda kırmızı et, işlenmiş et ve doymuş yağ tüketimi riski artırırken, lifli gıdalar, sebze, meyve ve tam tahılların tüketimi riski azaltıcı etki gösterebilir. Ayrıca obezite, özellikle abdominal obezite, kolon kanseri riskini yükselten bir faktördür. Sedanter yaşam biçimi, yetersiz fiziksel aktivite ve aşırı kalorili beslenme, bağırsak epitel hücrelerinde proliferasyonu teşvik ederek tümör gelişimine zemin hazırlayabilir (WCRF/AICR, 2018).

Sigara kullanımı ve aşırı alkol tüketimi de kolon kanseri riskini artırır. Sigara içenlerde adenomatöz polip gelişimi ve bu poliplerin kansere dönüşme olasılığı artarken, düzenli alkol tüketimi inflamatuvar süreçleri tetikleyerek kolon kanseri riskini yükseltir. Bazı

araştırmalar, aspirin gibi non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların uzun süreli kullanımının adenoma ve kolorektal kanser riskini azalttığını öne sürmektedir; ancak bu yaklaşımın yan etkileri ve bireysel farklılıkları göz önünde bulundurmak gerekir (Chan ve ark., 2011).

2.9. Kanser Araştırmalarında Biyobelirteçler

Kanser, karmaşık bir genetik, epigenetik ve çevresel etkileşim ağı sonucunda ortaya çıkan, heterojen ve dinamik bir hastalıklar bütünüdür (Hanahan ve Weinberg, 2011; Vogelstein ve Kinzler, 2004). Bu çok yönlü yapısı nedeniyle, kanserin erken tanısı, prognozun belirlenmesi, tedavi yanıtının izlenmesi ve kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarının geliştirilmesi için güvenilir araçlara ihtiyaç duyulmaktadır (Henry ve Hayes, 2012; Liotta ve Petricoin, 2010). Bu bağlamda biyobelirteçler (biomarker) olarak adlandırılan moleküler, genetik, epigenetik, protein, metabolit veya hücre bazlı göstergeler, kanser araştırmalarının merkezinde yer almaktadır (Pepe ve ark., 2001; Ghosh ve Laskar, 2020).

Biyobelirteçler, normal biyolojik süreçleri, patojenik olayları veya tedaviye yanıtı gösterebilen, objektif olarak ölçülebilir ve değerlendirebilir gösterge moleküller olarak tanımlanır (Henry ve Hayes, 2012; Diamandis, 2010). İdeal bir biyobelirteç, yüksek özgülük ve duyarlılık sergilemeli, kolay ve düşük maliyetli olarak saptanabilmeli, klinik pratiğe entegre edilebilir olmalı, hastalık sürecinin erken evrelerinde bile değişiklik gösterebilmeli ve tedavi seyri boyunca kullanılabilmelidir (Chan, 2010; Pepe ve ark., 2001).

Kanser biyobelirteçleri genellikle dört ana grupta toplanabilir: (1) DNA temelli belirteçler (mutasyonlar, kopya sayısı değişiklikleri, DNA metilasyonu), (2) RNA temelli belirteçler (mRNA, mikroRNA), (3) protein ve metabolit bazlı belirteçler (ör. PSA, CEA, CA-125), (4) hücreSEL belirteçler ve sirküle eden tümör hücreleri (CTC'ler), eksozomlar ve diğer hücre dışı veziküller (Henry ve Hayes, 2012; Schwarzenbach ve ark., 2011).

Kanser genetiği, onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, DNA onarım genlerinde hasar gibi yapısal ve işlevsel bozukluklar ile karakterizedir (Vogelstein ve Kinzler, 2004; Fernandes ve Hamdy, 2017). Hücre dışı dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA) ve mikrosatellit instabilite (MSI) gibi genetik belirteçler, kanser tanı ve takip sürecinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Wan ve ark., 2017; Le ve ark., 2015).

Kanser hücreleri ölümleri veya aktif salınım yoluyla dolaşıma DNA parçacıkları bırakır. Bu cfDNA (cell-free DNA) içerisinde tümöre özgü mutasyonlar, yapısal değişiklikler ve metilasyon paternleri taşıyan ctDNA, non-invaziv bir test aracı olarak “sıvı biyopsi” konseptini destekler (Schwarzenbach ve ark., 2011; Wan ve ark., 2017). ctDNA analizleri, tümör yükü, tedavi yanıtı, minimal rezidüel hastalık ve direnç mekanizmaları hakkında bilgiler sağlayarak klinik karar alma süreçlerini yönlendirebilir (Diamandis, 2010).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden modellemesi gibi epigenetik düzenlemeler kanser gelişiminde kritik bir rol oynar (Baylin ve Jones, 2011; Sharma ve ark., 2010). Özellikle tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde görülen anormal metilasyon paternleri, erken tanı biyobelirteçleri olarak değer kazanmaktadır. Örneğin, SEPT9 geninin hiper-metilasyonu kolorektal kanserin erken teşhisi için ticari testlerde kullanılmaktadır (Liotta ve Petricoin, 2010).

mRNA ekspresyon profilleri ve mikroRNA (miRNA) ekspresyon değişiklikleri, kansere özgü moleküler imzalar sunar (Ghosh ve Laskar, 2020; Henry ve Hayes, 2012). miRNA’lar, gen ifadesini post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyen küçük, kodlamayan RNA molekülleridir. Belirli miRNA’ların aşırı ekspresyonu veya baskılanması kanserin başlaması, progresyonu ve metastazında rol oynar (Schwarzenbach ve ark., 2011). Örneğin miR-21, pek çok solid tümörde onkojenik bir rol üstlenir ve dolaşımdaki miR-21 seviyesindeki artış tanı ve prognostik öngörülerde kullanılabilir (Henry ve Hayes, 2012). miRNA profillemesi, farklı kanser alt tiplerinin ayırt edilmesinde, tedavi hedeflerinin belirlenmesinde ve ilaç direncinin anlaşılmasında yarar sağlar (Ghosh ve Laskar, 2020).

Geleneksel tümör belirteçleri çoğunlukla protein kökenli moleküllerdir. PSA (Prostat Spesifik Antijen), CEA (Karsinoembriyonik Antijen), CA-125, CA-19-9 gibi protein bazlı belirteçler klinik uygulamada uzun yıllardır kullanılmaktadır (Chan, 2010; Henry ve Hayes, 2012). Bununla birlikte, bu klasik belirteçler sıklıkla spesifiklik ve duyarlılık sorunları yaşatabilmekte, tek başlarına kesin tanı koymada yetersiz kalabilmektedir (Diamandis, 2010).

Proteomik teknolojiler, kanser hücrelerinde ve tümör mikroçevresinde eksprese edilen proteinlerin küresel analizini mümkün kılar (Liotta ve Petricoin, 2010). Bu sayede tek bir biyobelirteç yerine, çoklu protein imzaları veya panel testleri oluşturularak daha yüksek

doğrulukla tanı ve prognostik öngörüler elde edilebilir. Örneğin, meme kanserinde HER2/neu proteinin aşırı ekspresyonu, hedefe yönelik tedavilerde tedavi kararı için kritik bir biyobelirteçtir (Rivenbark ve ark., 2013).

Kanser hücrelerinin metabolizması, normal hücrelere kıyasla belirgin farklılıklar gösterir (Warburg etkisi, lipid metabolizmasında değişiklikler vb.) (Ghosh ve Laskar, 2020). Metabolomik ve lipidomik yaklaşımlar, tümör spesifik metabolitleri ve lipid profillerini tespit ederek erken tanı, prognoz veya tedavi yanıtı hakkında bilgi verebilir (Henry ve Hayes, 2012).

Katı tümörlerden kopan kanser hücreleri, kan dolaşımına katılarak uzak organlara metastaz yapabilir. CTC'lerin tespiti ve sayımının artması, ilerleyen hastalık, agresif fenotip ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Fernandes ve Hamdy, 2017; Henry ve Hayes, 2012). CTC analizi, non-invaziv bir şekilde tümör dinamiklerini anlamak, tedaviye yanıtı takip etmek ve metastatik potansiyeli öngörmek için bir araç sunar. Bunun yanı sıra eksozomlar gibi hücre dışı veziküller, tümör hücrelerinden salınan proteinler, RNA'lar ve DNA fragmanları taşır (Hannafon ve Ding, 2013). Eksozom kaynaklı biyobelirteçler, tümörün moleküler profilini yansıtarak tanısal ve prognostik değere sahip olabilir (Wan ve ark., 2017).

Kanser biyobelirteçlerinin klinik uygulamaya aktarılmasında bazı zorluklar vardır. Öncelikle, birçok belirteç laboratuvar araştırma düzeyinde kalmakta, klinik validasyon ve standardizasyon süreçleri zaman alabilmektedir (Pepe ve ark., 2001). Ayrıca, kanserin heterojen yapısı nedeniyle tek bir biyobelirteç çoğu zaman tüm hastalara uymamakta, farklı kanser alt tipleri için spesifik paneller oluşturma ihtiyacı doğmaktadır (Henry ve Hayes, 2012; Diamandis, 2010). Buna ek olarak, biyobelirteç testlerinin duyarlılık, özgüllük, tekrar edilebilirlik ve maliyet-etkinlik gibi faktörler göz önünde bulundurularak klinik kılavuzlara entegre edilmesi gereklidir (Liotta ve Petricoin, 2010). İleri omiks teknolojilerinin (genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik) entegre kullanımı ve yapay zekâ destekli veri analizi, biyobelirteç keşfi ve doğrulama süreçlerini hızlandırabilir (Rivenbark ve ark., 2013; Ghosh ve Laskar, 2020).

Biyobelirteçler, kişiselleştirilmiş tıp veya bireyselleştirilmiş onkoloji yaklaşımlarının temelini oluşturur (Garraway ve Lander, 2013). Her hastanın tümörünün genetik ve moleküler profilinin belirlenmesi, hedefe yönelik tedavilerin seçimini, tedavi direncinin

önceden öngörülmesini, yan etki profilinin azaltılmasını ve hasta sağkalımının artırılmasını mümkün kılar. Örneğin, EGFR mutasyon analizi, akciğer kanserinde tirozin kinaz inhibitörlerinin etkinliğini belirlerken; ALK füzyon geninin varlığı, spesifik ALK inhibitörleriyle tedaviyi yönlendirmektedir (Soda ve ark., 2008).

Kanser araştırmalarında biyobelirteçler, tanı ve tedavide devrim niteliğinde ilerlemelere olanak sağlamaktadır. Yeni nesil dizi analiz teknolojileri, sıvı biyopsiler, yüksek verimli omiks yaklaşımları ve hassas ölçüm yöntemleri, çok sayıda yeni biyobelirtecin tanımlanmasını mümkün kılmaktadır (Ghosh ve Laskar, 2017).

2.9.1. Kanser biyobelirteçlerinin biyomoleküllere göre sınıflandırılması

Kanser biyobelirteçleri (tümör belirteçleri), kanserin erken teşhisi, prognozun belirlenmesi, tedavi yanıtının izlenmesi ve hastalığın seyri hakkında bilgi sahibi olunması için kullanılan, hücre veya vücut sıvılarında tespit edilebilen biyolojik moleküllerdir (Henry ve Hayes, 2012; Pepe ve ark., 2001). Bu biyobelirteçler, kanser hücreleri veya tümör mikrosistemleri tarafından üretilen, salgılanan ya da normal dokuların kanser gelişimi sırasında değişen metabolik ve moleküler özelliklerinin sonucu olarak ortaya çıkan proteinler, nükleik asitler, lipidler, karbonhidrat yapıları veya diğer küçük molekülleri içermektedir (Chan, 2010; Liotta ve Petricoin, 2010).

Biyobelirteçlerin biyomoleküler temelde sınıflandırılması, kanserin moleküler heterojenitesini anlamak ve kişiye özel tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır (Diamandis, 2010; Ghosh ve Laskar, 2020). Bu sınıflandırma yaklaşımı, temel olarak dört ana kategori altında incelenebilir: (1) Protein biyobelirteçler, (2) Nükleik asit biyobelirteçleri (DNA, RNA, miRNA, sirküle eden tümör DNA'sı), (3) Lipid bazlı biyobelirteçler, (4) Karbonhidrat ve glikokonjugat yapıları biyobelirteçler. Ayrıca, peptitler, metabolitler, eksozom kaynaklı moleküller gibi diğer biyolojik yapıların da önemi giderek artmaktadır (Hannafon ve Ding, 2013; Schwarzenbach ve ark., 2011).

2.9.1.1 Protein temelli biyobelirteçler

Kanserde en erken incelenen biyobelirteç gruplarından biri proteinlerdir. Protein bazlı biyobelirteçler, tümör hücreleri tarafından aşırı üretilen, modifiye edilen ya da normal hücrelerden salınan moleküllerdir (Henry ve Hayes, 2012). Kan ve diğer biyolojik sıvılarda

ölçülebilen birçok protein bazlı belirteç, klinik uygulamalarda halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, Prostat Spesifik Antijen (PSA) prostat kanseri tanısı ve takibinde, Karsinoembriyonik Antijen (CEA) kolorektal kanser ve diğer bazı solid tümörlerin izlenmesinde sıklıkla kullanılır (Chan, 2010; Ilango ve ark., 2010). CA-125, özellikle over kanserinin takibinde önemlidirken, HER2/neu proteininin ekspresyonu meme kanseri tedavisinde hedefe yönelik tedavilerin belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Rivenbark ve ark., 2013; Henry ve Hayes, 2012).

Protein temelli biyobelirteçlerin avantajları, klinik laboratuvarlarda ölçüm kolaylığı, antikor temelli immunoassay'lerle doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlamalarıdır (Wulfschle ve ark., 2003). Ancak, protein biyobelirteçlerin özgüllük ve duyarlılık problemleri, tek bir belirteç üzerinden tanı koymada sınırlılık yaratmaktadır. Bu nedenle, proteomik yaklaşımlar ve çoklu protein imza profilleri, tek parametrelili testlere kıyasla daha kapsamlı bilgi sunmakta ve tanısal gücü artırmaktadır (Liotta ve Petricoin, 2010; Wulfschle ve ark., 2003).

2.9.1.2. Nükleik asit temelli biyobelirteçler

Kanser oluşumu ve ilerlemesi, genetik ve epigenetik değişimlerin bir sonucudur (Fernandes ve Hamdy, 2017). Bu nedenle, nükleik asit bazlı biyobelirteçler (DNA, RNA ve ilgili alt gruplar) kanserin moleküler temelini anlamak için kritik öneme sahiptir. Özellikle tümör dokusundan veya sirkülasyondaki hücrelerden serbestleşen hücre dışı DNA (cell-free DNA, cfDNA) ve sirküle eden tümör DNA'sı (ctDNA) son yıllarda oldukça yoğun olarak araştırılmaktadır (Wan ve ark., 2017; Schwarzenbach ve ark., 2011).

- Tümör DNA'sı (ctDNA): ctDNA, kanda veya diğer vücut sıvılarında saptanabilen ve tümörle ilişkili genetik mutasyonlar, delesyonlar, amplifikasyonlar, metilasyon paternleri gibi spesifik değişiklikleri barındıran DNA parçalarıdır (Wan ve ark., 2017). Bu sayede, invazif olmayan sıvı biyopsilerle hastalığın tanısı, prognostik öngörüler ve tedavi etkinliği izlenebilir (Diamandis, 2010; Schwarzenbach ve ark., 2011).
- RNA ve mikroRNA (miRNA): RNA bazlı biyobelirteçler arasında messenger RNA (mRNA) ekspresyon profilleri ve küçük, kodlamayan RNA tiplerinden olan mikroRNA'lar önemli bir yer tutar. miRNA'lar, gen ifadesinin posttranskripsiyonel

düzenlenmesinde görev alır ve belirli kanser tiplerinde miRNA ekspresyon profilleri tanısal ve prognostik işaretler sunar (Henry ve Hayes, 2012; Ghosh ve Laskar, 2020). Örneğin, miR-21'in birçok solid tümörde aşırı eksprese olması, onun potansiyel bir evrensel onkojenik miRNA biyobelirteci haline getirmiştir (Schwarzenbach ve ark., 2011).

- Epigenetik Belirteçler (Metilasyon, Histon Modifikasyonları): DNA metilasyon paternlerindeki değişiklikler, kansere özgü epigenetik belirteçlerin tanımlanmasını sağlamaktadır. Özellikle tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerinde anormal metilasyonun gözlenmesi, erken tanı ve prognostik değerlendirmede önemli bir rol oynar (Liotta ve Petricoin, 2010; Fernandes ve Hamdy, 2017).

2.9.1.3. Lipid temelli biyobelirteçler

Lipid metabolizması, kanser hücrelerinin proliferasyon, invazyon ve metastazında kritik işlevlere sahiptir (Zhang ve Liu, 2002). Kanser hücreleri, normal hücrelere kıyasla farklı lipid profillerine ve membran yapısına sahiptir. Bu durum, lipidomik analizlerin potansiyel tümör belirteçlerini ortaya çıkarma olasılığını doğurmaktadır (Henry ve Hayes, 2012; Ghosh ve Laskar, 2020). Örneğin fosfolipit, sfingolipit ve kolesterol metabolitlerindeki değişimler, hem kanserin agresifliğini hem de tedavi yanıtını izleme açısından belirleyici olabilir. Lipidome analizleri, hedefe yönelik tedavi süreçlerinde lipid enzimlerinin veya ilgili sinyal yollarının inhibe edilmesiyle hastalık seyri üzerinde etkili olabilecek stratejiler geliştirmeyi mümkün kılmaktadır (Liotta ve Petricoin, 2010).

2.9.1.4. Karbonhidrat ve glikokonjugat temelli biyobelirteçler

Kanser hücrelerinin yüzeyinde yer alan glikoproteinler, glikolipitler ve diğer glikokonjugat yapılar, hücre-hücre etkileşimleri, metastaz, adezyon ve immün yanıt düzenlenmesi gibi pek çok süreçte rol oynamaktadır (Chan, 2010; Henry ve Hayes, 2012). Bu yapılar, normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde farklı glikolizasyon paternleri sergileyebilir. Örneğin, CA-19-9 gibi glikoprotein yapıları tümör belirteçleri, özellikle pankreas kanseri ve bazı gastrointestinal kanserlerin izlenmesinde kullanılmaktadır (Ilango ve ark., 2010).

Glikomik çalışmalar, kanserli hücrelerin yüzey glikan profillerindeki değişiklikleri sistematik olarak inceleyerek, yeni biyobelirteç adaylarının belirlenmesini ve biyobelirteç panellerinin oluşturulmasını mümkün kılar (Pepe ve ark., 2001; Liotta ve Petricoin, 2010).

2.9.1.5. Diğer biyobelirteç türleri: eksozomlar, metabolitler ve hücresel bileşenler

Eksozomlar, tümör hücrelerinin yanı sıra tümör mikroçevresindeki diğer hücreler tarafından salgılanan hücre dışı veziküllerdir. İçerdikleri proteinler, nükleik asitler ve lipidlerle kanserin moleküler imzasını yansıtır (Hannafon ve Ding, 2013; Wan ve ark., 2017).

Eksozomal miRNA, DNA, protein ve lipid analizi, minimal invazif sıvı biyopsi yaklaşımları ile hastalığın tespiti, prognostik sınıflandırma ve tedavi stratejilerinin belirlenmesi açısından umut vadetmektedir.

Ayrıca hücresel seviyede değerlendirilen sirküle eden tümör hücreleri (CTC'ler), metastaz potansiyeli hakkında önemli bilgiler sunan biyobelirteçlerdir (Fernandes ve Hamdy, 2017). Benzer şekilde, kanser metabolizmasındaki değişiklikler sonucunda oluşan spesifik metabolitler, metabolomik analizlerle ortaya çıkarılarak erken tanı ve tedavi sürecinde kullanılabilecek biyobelirteç adayları olarak belirlenebilmektedir (Ghosh ve Laskar, 2020).

2.9.1.6. Çoklu biyobelirteç panelleri ve kişiselleştirilmiş tıp

Tek bir biyobelirtecın kanserin heterojen yapısı nedeniyle her zaman yeterli tanısal veya prognostik güç sağlamadığı görülmüştür. Bu nedenle, farklı biyomoleküler sınıflardan gelen çoklu biyobelirteç panelleri, yüksek tanı gücü ve prognostik değer sunabilmektedir (Diamandis, 2010; Pepe ve ark., 2001). Proteomik, genomik, epigenomik, transcriptomik, lipidomik ve metabolomik verilerin entegrasyonu, bireye özgü kanser profilinin belirlenmesine, böylece tedavinin kişiselleştirilmesine katkı sağlar (Rivenbark ve ark., 2013; Liotta ve Petricoin, 2010).

2.9.2. Kanser araştırmalarında kullanılan genler

Kanser, karmaşık ve çok boyutlu bir hastalık olup, genetik ve epigenetik değişimlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Vogelstein ve Kinzler, 2004; Hanahan ve Weinberg,

2011). Bu nedenle, kanser araştırmalarında belirli genlerin incelenmesi, tanı, prognoz, tedavi hedefleri ve direnç mekanizmalarının anlaşılması açısından kritik bir öneme sahiptir (Stratton ve ark., 2009). İlgili genler arasında onkogenler, tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri, epigenetik düzenleyici genler ve hücre siklusu kontrolüne dâhil olan genler ön plana çıkmaktadır. Bu genlerin işlevsel analizi, yeni biyobelirteçlerin keşfi, kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarının geliştirilmesi ve hedefe yönelik tedavilerin tasarlanmasında temel bir dayanak noktası olarak karşımıza çıkar (Vogelstein ve ark., 2013; Garraway ve Lander, 2013).

Onkogenler, normal hücrelerde büyüme ve bölünmeyi düzenleyen proto-onkogenlerin mutasyon veya aşırı ekspresyon sonucu hücre proliferasyonunu kontrolsüz hale getiren genlerdir (Weinberg, 2007; Sharma ve ark., 2010). Bu genlerdeki aktivasyon mutasyonları, translokasyonlar, gen amplifikasyonları ya da epigenetik düzenlemeler, kanser gelişiminde önemli rol oynar.

- *RAS* Gen Ailesi (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*): *RAS* ailesi genleri, hücre içi sinyal iletiminde anahtar rol oynayan GTPaz enzimlerini kodlar (Cox ve ark., 2015). *KRAS* mutasyonları özellikle pankreas, kolorektal ve akciğer kanserlerinde sıkça tespit edilmektedir (Prior ve ark., 2012). Bu mutasyonlar, hücreleri sürekli çoğalma sinyallerine maruz bırakarak tümör oluşumunu tetikler. *KRAS* mutasyon durumunun tespit edilmesi, antitümör tedavilerin seçiminde ve prognoz tahminlerinde önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır (Karapetis ve ark., 2008).
- *MYC* Ailesi (*c-MYC*, *N-MYC*, *L-MYC*): *MYC* onkogenleri, hücre büyüme, metabolizma ve transkripsiyonel düzenlemede kritik rol oynayan transkripsiyon faktörlerini kodlar (Dang, 2012). *c-MYC*'in aşırı ekspresyonu meme, kolorektal ve akciğer kanserleri dahil pek çok solid tümörde, *N-MYC* ise özellikle nöroblastomda sık gözlenir (Brodeur, 2003). *MYC* gen amplifikasyonları ya da epigenetik kontrol bozuklukları, hücrenin proliferasyonunu ve metabolik gereksinimlerini tümör lehine çevirerek malign fenotipin yerleşmesine katkıda bulunur.
- *EGFR*, *HER2/neu (ERBB2)* ve *BRAF*: Hücre yüzey reseptör tirozin kinazlarını kodlayan genler (örneğin, *EGFR* ve *HER2*), kanser hücrelerinde sinyal yollarının sürekli aktif kalmasına yol açar (Yarden ve Sliwkowski, 2001). Özellikle *HER2*

amplifikasyonları meme kanserinin belirli alt tiplerinde yaygındır ve anti-*HER2* hedefli tedaviler (ör. Trastuzumab) bu tümörlerde klinik fayda sağlamaktadır (Slamon ve ark., 1987). *BRAF* geninde görülen V600E gibi aktivasyon mutasyonları, özellikle melanomda yaygın olup, hedefe yönelik *BRAF* inhibitörleri ile tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanır (Chapman ve ark., 2011).

Tümör baskılayıcı genler, normal şartlar altında hücre çoğalmasını sınırlayan, DNA tamir mekanizmalarını destekleyen, hücre farklılaşmasını ve programlı hücre ölümünü (apoptoz) sağlayan genlerdir (Weinberg, 2007; Vogelstein ve Kinzler, 2004). Bu genlerde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları, kanserleşme sürecinde kritik rol oynar.

- *TP53*: *TP53*, muhtemelen kanser araştırmalarının en yoğun odaklandığı tümör baskılayıcı gendir (Vousden ve Prives, 2009). DNA hasarı sonrasında hücre siklusunu durduran, DNA tamirini tetikleyen ve hasar onarılamazsa apoptozu başlatan p53 proteini, kanserlerin yarısından fazlasında mutasyon veya fonksiyon kaybı yaşamaktadır (Olivier ve ark., 2010). *TP53*'ün mutasyon analizi, prognostik anlamda önemli bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca p53 yolaklarını yeniden aktive etmeye yönelik tedaviler kanser biyolojisinin güncel araştırma alanları arasındadır (Lane, 2010).
- *RB1* (*Retinoblastoma* geni): *RB1* geni, hücre siklusunun G1/S kontrol noktasında rol oynar ve mutasyonları retinoblastoma, osteosarkoma ve bazı küçük hücreli akciğer kanseri tiplerinde sıkça görülür (Dick ve Rubin, 2013; Knudson, 1971). *RB1* kaybı, hücre siklusunun kontrolünü ortadan kaldırarak hücrelerin sınırsız çoğalmasına izin verir. *RB1* yolaklarındaki değişimlerin anlaşılması, hedefe yönelik siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri gibi ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olmuştur (VanArsdale ve ark., 2015).
- *PTEN*: *PTEN*, fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolunu negatif düzenleyen bir tümör baskılayıcı gen olup özellikle meme, prostat, endometriyum ve glioblastomlarda sıklıkla fonksiyon kaybına uğramaktadır (Song ve ark., 2012). *PTEN* kaybı, hücre büyümesi ve hayatta kalmasını artıran sinyal yollarının kontrolsüz aktivasyonuna neden olur. Bu nedenle *PTEN* işlev kaybını tespit etmek,

PI3K/AKT/mTOR yolağını hedefleyen antitümör stratejilerin geliştirilmesine öncülük etmektedir (Liaw ve ark., 1997).

- *BRCA1* ve *BRCA2*: *BRCA1* ve *BRCA2* genleri, DNA çift zincir kırıklarının onarılmasında kritik rol oynar (Venkitaraman, 2002). Bu genlerdeki kalıtsal mutasyonlar, meme ve over kanserleri riskini belirgin derecede artırmaktadır (Antoniou ve ark., 2003). *BRCA* mutasyon analizi, genetik danışmanlık, risk değerlendirmesi ve *PARP* inhibitörleri gibi hedefe yönelik tedavilerin seçimi açısından önemlidir (Lord ve Ashworth, 2016).

Kanser, genellikle DNA hasar onarım mekanizmalarının bozulması sonucu ortaya çıkar. Bu nedenle DNA tamir genleri, kanser araştırmalarında kilit konumdadır (Hoeijmakers, 2001). Örneğin *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* gibi genlerdeki kusurlar, mikrosatellit instabiliteye (MSI) ve kolorektal kanser dâhil çeşitli malignitelere yol açar (Lynch ve De la Chapelle, 2003). DNA tamir genlerinin analizi, immünoterapi yanıt öngörüsü ve kemoterapi hassasiyetinin tahmin edilmesinde kullanılmaktadır (Le ve ark., 2015).

Epigenetik düzenleyici genler kanser teşhis ve tedavisinde sık başvurulanan genlerdir. Kanser gelişiminde sadece DNA dizisindeki değişiklikler değil, aynı zamanda kromatin yapısı, histon modifikasyonları ve DNA metilasyon paternleri önemlidir. Bu süreçleri düzenleyen genler (ör. *DNMT3A*, *TET2*, *EZH2*) epigenetik programı değiştirerek gen ifadesini kontrol eder (Baylin ve Jones, 2011; Helin ve Dhanak, 2013). Lösemi, lenfoma ve bazı solid tümörlerde bu genlerdeki mutasyonlar veya ekspresyon değişiklikleri hücre farklılaşmasını bozar, kök hücre özelliklerini artırır ve tümör progresyonunu destekler. Epigenetik değişimlerin geri dönüşümlü yapısı, epigenetik ilaçların (ör. DNA metiltransferaz inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri) kullanımını teşvik etmektedir (Sharma ve ark., 2010).

Hücre siklusu, CDK ve siklin proteinleri tarafından düzenlenir. CDK-inhibitörleri (*p16^{INK4A}*, *p21^{CIP1}*) ve siklin genleri (*CCND1* gibi), tümör oluşumunda kritik roller üstlenir (Massagué, 2004). Aynı şekilde, apoptoz ile ilişkili genler (ör. *BCL-2* ailesi genleri, *BAX*, *BAK*, *BID*) kanser hücrelerinin immünoterapi ve kemoterapi yanıtlarını belirlemede etkilidir (Cory ve Adams, 2002). Bu genlerin ekspresyon ve mutasyon analizleri, ilaç direnci ve tedavi kombinasyonlarının tasarlanmasında yol göstericidir.

Yeni nesil dizileme teknolojileri (NGS) sayesinde, kanser genomlarında mutasyonlar, kopya sayısı varyasyonları, yapısal yeniden düzenlenmeler ve füzyon genler hızla tespit edilebilmektedir (Stratton ve ark., 2009; Garraway ve Lander, 2013). Bu yaklaşımlar, kanserin moleküler alt tiplerini sınıflandırmaya, tedaviye yanıtı öngörmeye ve direnç mekanizmalarını aydınlatmaya yardımcı olmaktadır. Örneğin, *ALK* füzyon genleri küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (KHDAK) hedefe yönelik tedavilerin seçimi için kritik bir biomoleküler belirteç olarak kullanılır (Soda ve ark., 2007).

CRISPR/Cas9 gibi gen düzenleme teknolojileri, kanserle ilişkili genlerin fonksiyonel analizini kolaylaştırarak tümör hücrelerinde spesifik genleri hedef alan hassas tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlar (Shalem ve ark., 2015). Ayrıca, single-cell RNA dizileme yöntemleriyle tek hücre düzeyinde gen ekspresyon profilleri çıkarılarak, tümör heterojenitesi ve klonal evrimi aydınlatılabilmektedir (Navin, 2014).

Kanser araştırmalarında kullanılan genlerin tanımlanması, kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımını destekler. Hastanın tümörüne özgü gen mutasyon profili, hangi hedefe yönelik tedavinin seçileceğini ve hangi kombinasyonların daha etkin olabileceğini belirler (Vogelstein ve ark., 2013). Ayrıca, prognostik gen imzaları, immünoterapilere yanıtı öngören genetik belirteçler (ör. *PD-L1* ekspresyonunu düzenleyen genetik değişiklikler) ve direnç mekanizmalarını gösteren gen panelleri klinik karar alma süreçlerinde giderek daha fazla rol oynamaktadır (Topalian ve ark., 2012; Ghosh ve Laskar, 2020).

Kanser araştırmalarında kullanılan genlerin incelenmesi, hem kanserin temel mekanizmalarını anlamayı hem de klinik uygulamalarda devrim niteliğinde gelişmeler sağlamayı mümkün kılmaktadır. Onkogenler, tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri, epigenetik düzenleyici genler ve hücre siklusu denetleyicileri, tanı, tedavi ve prognostik yaklaşımlarda doğrudan etkili olmaktadır. Yeni nesil genomik teknolojiler ve gen düzenleme yöntemleri, bu genlerin daha iyi anlaşılmasını ve daha etkili, kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesini destekleyen önemli araçlar haline gelmiştir.

2.9.2.1. Sitokrom P450 geni

Sitokrom P450 (CYP) enzim ailesi, hem insan hem de birçok diğer organizmada, endojen maddelerin ve ksenobiyotik bileşiklerin (örneğin ilaçlar, toksinler, pestisitler, kanserojenler) metabolizmasında kilit rol oynayan geniş bir hemoprotein süper ailesidir (Guengerich, 2015; Nebert ve Dalton, 2006; Nelson, 2009). Bu enzimler, karaciğer başta olmak üzere böbrek, akciğer, bağırsak mukozası ve beyin gibi farklı dokularda eksprese edilir (Zanger ve Schwab, 2013). *Sitokrom P450* genleri, hücre içi sinyal yolları, hormon sentezi, yağ aside metabolizması, steroid biyosentezi gibi endojen süreçlerin yanı sıra, vücuda alınan kimyasal maddelerin biyotransformasyonunda da temel belirleyicilerdir (Nebert ve Dalton, 2006; Rendic ve Guengerich, 2012).

CYP genleri, evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuş olup ökaryotlardan prokaryotlara kadar geniş bir canlı yelpazesinde bulunur (Nelson, 2009). İnsan genomunda yaklaşık 57 fonksiyonel *CYP* geni ve bunlarla ilişkili yaklaşık 58 psödogen tanımlanmıştır (Zanger ve Schwab, 2013; Nelson, 2009). Bu genler, fonksiyonel benzerliklerine, amino asit dizisi homolojilerine ve katalitik özelliklerine göre ailelere ve alt ailelere ayrılır. Örneğin, insan *sitokrom P450* ailesindeki en yaygın olarak incelenen genler arasında *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* ve *CYP4* aileleri bulunur. Bu alt ailelerin her biri, spesifik substrat profillerine, doku dağılımlarına ve regülasyon modellerine sahiptir (Guengerich, 2015).

Sitokrom P450 proteinleri, yapısal olarak bir hem grubu içeren aktif bölgeye sahiptir. Bu hem grubu, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize ederken oksijen moleküllerini bağlayıp aktifleştirerek substratın hidroksilasyon, demetilasyon ya da epoksidasyon gibi kimyasal modifikasyonlarını sağlar (Guengerich, 2015). Bu sayede CYP enzimleri, lipofilik bileşikler daha hidrofilik türevlerine dönüştürerek vücuttan atılabilir hale getirir.

CYP genlerinin ekspresyon düzeyleri, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucunda belirlenir (Zanger ve Schwab, 2013). Gen ekspresyonu; nükleer reseptörler (ör. CAR, PXR, AhR), transkripsiyon faktörleri (ör. HNF4α), epigenetik değişiklikler (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları) ve miRNA'lar gibi birçok moleküler mekanizma ile düzenlenebilir (Zanger ve Schwab, 2013; Lamba ve ark., 2006).

CYP genlerinde gözlenen genetik varyasyonlar (polimorfizmler), bireylerin ilaç metabolizmasına verdikleri yanıtı, çevresel toksinlere duyarlılıklarını ve hatta hastalıklara yatkınlıklarını etkiler (Nebert ve Dalton, 2006; Lamba ve Schuetz, 2006). Özellikle ilaç metabolizmasında rol oynayan *CYP2D6*, *CYP2C19* ve *CYP2C9* gibi genlerde görülen fonksiyonel polimorfizmler, “hızlı metabolize edici” veya “yavaş metabolize edici” fenotiplerin oluşmasına neden olur (Zanger ve Schwab, 2013). Bu durum, klinik uygulamalarda ilacın etkililiği, dozaj ayarlamaları, yan etki profili ve toksisite riski üzerinde belirleyici bir faktördür (Rendic ve Guengerich, 2012).

İlaç metabolizması üç temel fazda incelenir:

1. Faz I Reaksiyonları: Oksidasyon, redüksiyon ve hidroksilasyon işlemleri ile ilacın yapısı değiştirilerek daha polar hale getirilir. CYP enzimleri bu aşamada en kritik rolü oynar (Guengerich, 2015; Wrighton ve ark., 1987).
2. Faz II Reaksiyonları: Faz I’de oluşan reaktif ara ürünler konjugasyon (ör. glukuronidasyon, sülfatlama, asetilasyon) reaksiyonlarına tabi tutularak daha hidrofilik ve genellikle inaktif metabolitlere dönüştürülür.
3. Faz III Reaksiyonları: Oluşan metabolitler hücre dışına pompalama, safra ya da idrar yoluyla atılır.

CYP3A4, insan karaciğerindeki en bol CYP izoformudur ve metabolize edilen ilaçların önemli bir kısmından sorumludur (Zanger ve Schwab, 2013). Benzer şekilde *CYP2D6* ve *CYP2C19* da birçok ilacın metabolizmasında kritik rol oynar. Bu enzimlerin aktivitesindeki varyasyonlar, hastaların standart dozajlarda dahi beklenenden farklı klinik yanıtlar göstermesine neden olabilir (Lamba ve Schuetz, 2006).

Sitokrom P450 enzimleri, sadece ilaç metabolizması değil aynı zamanda ksenobiyotiklerin (ör. polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler) aktivasyon ve detoksifikasyon aşamalarında rol aldığı için kanser gelişimiyle de yakından ilişkilidir (Nebert ve Dalton, 2006). Bazı CYP enzimleri, pro-karsinojenleri DNA hasarına neden olabilecek reaktif türevlere dönüştürerek kanser riskini artırabilirken, diğerleri bu maddeleri zararsız hale getirecek metabolitlere dönüştürerek kanser riskini azaltabilir (Rendic ve Guengerich,

2012). Örneğin, *CYP1A1*, tütün dumanındaki polisiklik aromatik hidrokarbonları aktifleşmiş karsinojenik metabolitlere dönüştürür (Nebert ve Dalton, 2006). Bu nedenle, *CYP* gen ekspresyon profilleri ve polimorfik varyantları, bireyin çevresel karsinojenlere olan duyarlılığını belirleyebilir. Ayrıca tümör dokularında *CYP* enzim düzeylerinin değişimi, kanser hücrelerinin ilaç direncine katkıda bulunabilir. Özellikle kemoterapötik ilaçların metabolizmasında rol oynayan *CYP* enzimlerindeki ekspresyon değişiklikleri, ilacın etkisizleşmesine veya artan toksisiteye neden olabilir (Lamba ve Schuetz, 2006).

CYP gen ekspresyonu dokuya özgü paternler sergiler. Karaciğer, ilaç metabolizmasında en kritik organ olup, en yüksek *CYP* aktivitesine sahip organdır (Wrighton ve ark., 1987). Buna karşılık bağırsak mukozası, akciğer, deri, beyin ve böbreklerde de belirli *CYP* izoformları ifade edilir (Zanger ve Schwab, 2013). Örneğin, *CYP2D6* merkezi sinir sistemindeki bazı ilaçların metabolizmasında önemli rol oynarken, *CYP1B1* gibi bazı izoformlar meme dokusu ve diğer ekstrahepatik dokularda ifade edilerek kanser riskini etkileyebilir (Nebert ve Dalton, 2006).

CYP genlerinin ekspresyonu karmaşık bir düzenleme ağı tarafından kontrol edilir. Nükleer reseptörler (ör. Pregnan X reseptörü [PXR], Constitutive Androstane Reseptörü [CAR], Aryl Hydrocarbon Reseptörü [AhR]) çevresel kimyasalları, ilaçları ve endojen hormonları algılar ve *CYP* gen transkripsiyonunu etkiler (Zanger ve Schwab, 2013). Böylece organizma, maruz kalınan kimyasal profilini algılayarak biyotransformasyon kapasitesini dinamik bir şekilde ayarlayabilir.

CYP gen polimorfizmlerinin belirlenmesi, farmakogenetik testler aracılığıyla kişiye özel ilaç tedavisinin planlanmasında giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Lamba ve Schuetz, 2006). Özellikle onkoloji, psikiyatri ve kardiyoloji gibi alanlarda kullanılan ilaçların etkinliği ve toksisite profilinin anlaşılması için *CYP* genotiplenmesi, hastanın tedavi yanıtını öngörmede kullanılabilir. Örneğin, *CYP2D6* genotipi, bazı antidepresanların, beta-blokerlerin ve opioid analjeziklerin doz ayarlamasında belirleyici bir faktördür (Zanger ve Schwab, 2013).

Sitokrom P450 genleri, farmakoloji, toksikoloji, onkoloji ve kişiselleştirilmiş tıp açısından merkezi bir konuma sahiptir. Bu gen ailesinin yapısı, polimorfizmleri, ekspresyon düzenlemeleri ve fonksiyonel özellikleri, ilaç yanıtları ile kanser riskinin belirlenmesinde

anahtar rol oynar. Gelişen genomik, proteomik ve metabolomik yaklaşımlar, CYP enzimlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak farmakoterapide bireysel farklılıkların yönetilmesine ve kanser dâhil olmak üzere birçok hastalığa karşı daha etkin önlemler alınmasına olanak tanımaktadır (Guengerich, 2015; Zanger ve Schwab, 2013).

2.9.2.2. *BCL2* geni

BCL2 (B-Cell Lymphoma 2) geni, hücre ölümünü (apoptoz) düzenleyen temel genlerden biri olarak kanser araştırmalarında ve hücre biyolojisinde büyük bir öneme sahiptir (Cory ve Adams, 2002; Tsujimoto ve ark., 1984). 1980'li yıllarda, foliküler lenfomada t(14;18)(q32;q21) kromozom translokasyonunun keşfi ile *BCL2* geni bilim dünyasının dikkatini çekmiş, bu translokasyon sonucunda *BCL2* ekspresyonunun artması ve hücrelerin ölüm sinyallerine direnç kazanması lenfomagenezde kritik bir basamak olarak tanımlanmıştır (Tsujimoto ve ark., 1984; Vaux ve ark., 1988).

BCL2 geni, insan genomunda 18. kromozomun uzun kolunda (18q21) yer alır (Adams ve Cory, 2007). Gen, çeşitli ekzon ve intronlardan oluşur ve farklı doku ve koşullarda alternatif splicing yoluyla farklı izoformlar üretir. *BCL2* ailesi üyeleri, hücre içi ölüm-sinyal yollarında fonksiyonel rollerine göre anti-apoptotik (*BCL2*, *BCL-XL*, *MCL1* vb.) ve pro-apoptotik (*BAX*, *BAK*, *BID*, *BIM* vb.) olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Youle ve Strasser, 2008). *BCL2* proteini, mitokondri dış membranında ve endoplazmik retikulumda lokalize olur, hücrenin apoptoza karşı direncini artırarak hücre hayatta kalma yollarını destekler.

BCL2 proteini, heliks-demet yapıda olup, BH (*BCL2* Homology) bölgeleri olarak adlandırılan koruyucu yapısal motifler içerir (Adams ve Cory, 2007). Bu BH motifleri (BH1, BH2, BH3 ve BH4), proteinin diğer *BCL2* ailesi üyeleriyle etkileşimini ve mitokondri membran geçirgenliğinin düzenlenmesini sağlar. Özellikle BH3-only adı verilen pro-apoptotik proteinlerle olan etkileşimler, hücre içi ölüm/yaşam dengesinin temelini oluşturur (Youle ve Strasser, 2008; Bölükbaşı ve ark., 2023).

BCL2'nin temel fonksiyonu, mitokondri dış zarında por oluşumunu engelleyerek sitokrom c salınımını baskılamak ve böylece apoptozun nihai efektörleri olan kaspazların aktivasyonunu önlemektir (Chipuk ve ark., 2010). Böylece *BCL2*, hücrenin proliferasyona devam etmesini ve stres koşullarında dahi ölüm sinyallerine direnç kazanmasını sağlar.

BCL2 ekspresyonu ve aktivitesi, hücre içi ve hücre dışı birçok sinyal tarafından düzenlenir. Transkripsiyon faktörleri (NF- κ B, STAT3, WT1 vb.), epigenetik modifikasyonlar (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları), mikroRNA'lar (miR-15a/16-1 gibi tümör baskılayıcı miRNA'lar), post-translasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon, ubiquitinasyon) *BCL2*'nin işlevini ve ekspresyon düzeyini etkiler (Croce, 2008; Cimmino ve ark., 2005).

Özellikle miR-15a ve miR-16-1'in *BCL2* mRNA'sını hedef alarak translasyonunu baskılaması, kronik lenfositik lösemi (KLL) gibi bazı kanser tiplerinde *BCL2* ekspresyonunun kontrolünde kritik bir mekanizma olarak tanımlanmıştır (Cimmino ve ark., 2005). Translokasyonlar, gen amplifikasyonları veya promotör bölgesi metilasyon paternlerindeki değişiklikler de *BCL2* düzeylerinin değişmesine neden olabilir.

BCL2 proteini, BAX ve BAK gibi gözenek oluşturuucu pro-apoptotik proteinlerle etkileşerek onların mitokondri dış membranda gözenek oluşturmaya engel olur (Cory ve Adams, 2002). Bu denge, BH3-only proteinlerin (örn. BIM, BID, PUMA) varlığıyla daha da hassas bir şekilde düzenlenir. BH3-only proteinler, *BCL2*'nin anti-apoptotik etkisini bloke ederek BAX ve BAK'ın oligomerizasyonuna izin verir, böylece mitokondri dış zar geçirgenliği artar ve apoptoz yolları tetiklenir (Youle ve Strasser, 2008).

BCL2, ilk olarak insan foliküler lenfomasında tanımlanmış olsa da farklı solid ve hematolojik tümörlerde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir (Reed, 1998). Artmış *BCL2* ekspresyonu kanser hücrelerinde apoptoz direncini artırarak kemoterapötik ilaçlara, radyoterapiye ve diğer tedavilere karşı direnç geliştirir (Cory ve Adams, 2002; Adams ve Cory, 2007). Örneğin meme kanseri, prostat kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve melanoma gibi solid tümörlerde de *BCL2* ekspresyonunda artış tespit edilmiştir (Reed, 1998).

Hematolojik maligniteler arasında *BCL2*'nin rolü özellikle iyi çalışılmıştır. *foliküler lenfoma*, *diffüz büyük B hücreli lenfoma*, KLL, akut myeloid lösemi (AML) gibi birçok hematolojik kanserde *BCL2* ile ilgili genetik ve epigenetik değişiklikler hastalığın patogeneğinde anahtar rol oynar (Adams ve Cory, 2007; Tsujimoto ve ark., 1984).

BCL2'nin anti-apoptotik rolü, onu kanser tedavileri için çekici bir hedef haline getirmiştir. Son yıllarda geliştirilen BH3 mimetik ilaçlar, *BCL2*'yi hedef alarak anti-apoptotik kapasitesini bloke eder (Vogler ve ark., 2009). Bu ajanlar, *BCL2*'nin pro-apoptotik proteinlerle etkileşimini engelleyerek kanser hücrelerinin apoptoza daha duyarlı hale gelmesini sağlar.

Venetoclax (ABT-199) adlı *BCL2* inhibitörü, özellikle KLL ve bazı diğer hematolojik kanserlerde klinik etkinlik göstermiştir (Souers ve ark., 2013). Bu ilacın kullanımı ile hastalarda remisyon oranlarında ve genel sağkalımda belirgin iyileşmeler gözlenmiştir. Ayrıca, *BCL2* inhibitörleri diğer hedefe yönelik tedaviler, immünoterapiler veya kemoterapilerle kombinasyon halinde kullanılarak daha güçlü anti-tümör yanıtlar elde edilebilmektedir (Konopleva ve Letai, 2018).

BCL2 inhibitörleriyle tedavi edilen hastalarda zamanla direnç gelişebilmektedir. Direnç mekanizmaları arasında *BCL2* mutasyonları, MCL1 gibi alternatif anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun artması veya BH3-only proteinlerin azalması gibi çeşitli moleküler adaptasyonlar yer alır (Carter ve ark., 2020). Bu direnç mekanizmalarını anlamak, daha etkili tedavi kombinasyonları ve yeni nesil *BCL2* ailesi inhibitörlerinin geliştirilmesi için gereklidir.

BCL2 sadece kanser değil, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve iskemik hasar gibi pek çok patolojik süreçte de rol oynar (Reed, 1998; Adams ve Cory, 2007). Örneğin nöronlarda *BCL2* ekspresyonunun artması hücre ölümünü önleyebilir, bu da nörodejeneratif hastalıklar için potansiyel bir terapi hedefi olabileceğine işaret eder (Vaux ve ark., 1988). Benzer şekilde, aşırı *BCL2* ekspresyonu otoimmün hastalıklarda lenfositlerin normal apoptoz döngüsünden sapmasına ve anormal immün yanıt devamlılığına neden olabilir (Strasser ve ark., 2000).

BCL2 geninin fonksiyonel rolü, kanser ve diğer patolojik durumların anlaşılmasında kritik bir dönüm noktası olmuştur. Onun keşfi, apoptozun genetik olarak kontrol edilen bir süreç olduğunu ortaya koymuş ve kanserin sadece kontrolsüz proliferasyon değil, aynı zamanda yetersiz hücre ölümü olduğunu da kanıtlamıştır (Cory ve Adams, 2002; Youle ve Strasser, 2008).

Teknolojik ilerlemeler, CRISPR/Cas9 gibi gen düzenleme araçlarının kullanılması, tek hücre omik teknolojileri ve yüksek kapasiteli ilaç taramaları, *BCL2* sinyal yolağını daha iyi anlamamızı ve kanser tedavilerinde *BCL2* hedefli yeni yaklaşımlar geliştirmemizi kolaylaştıracaktır (Konopleva ve Letai, 2018).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde, tez çalışmasında kullanılan farklı *Cladonia* (L.) liken türlerinden elde edilen ekstraktlar kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle çiçek şekilli hibrit nanoyapılar sentezlenmiştir. Sentezlenen bu nanoyapıların antikanser etkilerini değerlendirmek amacıyla, insan kolon kanseri (DLD-1) ve sağlıklı kolon epitelyal (CCD-18Co) hücre hatları kullanılarak sitotoksikite testleri (MTT) uygulanmış; ayrıca gen ekspresyon düzeyleri incelenerek moleküler biyolojik etkileri detaylı olarak analiz edilmiştir.

3.1. Nanomalzemelerin Sentezi

Nanomalzemelerin sentezi, nanoboyuttaki yapıların kontrollü olarak üretilmesini amaçlayan bir süreçtir. Bu süreçte top-down ve bottom-up yaklaşımları kullanılırken, özellikle yeşil sentez gibi çevre dostu yöntemler sürdürülebilir üretim açısından önem kazanmaktadır. Sentez yöntemi, nanomalzemenin özelliklerini ve uygulama potansiyelini doğrudan belirlemektedir.

3.1.1 Nano-Malzemelerin sentezi için liken özütünün elde edilmesi

Cladonia subulata ve *Cladonia rangiformis* liken türleri; her ikisi de ayrı ayrı yıkanıp kurutuldu. Daha sonra her iki liken türünden 10 gram tartılarak, 100 ml distile su ile 85 °C’de yaklaşık 1 saat süreyle bekletilmiştir. 5000 rpm ile 5 dk boyunca santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Daha sonra Whatman No-1 filtre kâğıdı ile süzülen özütler çiçek sekilli hibrit nanoyapıların sentezinde kullanılmak amacıyla muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların sentezi

Çiçek sekilli hibrit nanoyapıların sentezinde optimize sentez koşullarının belirlenmesi amacıyla liken özütleri farklı hacimlerde (0.5 ml, 1.5 ml) alınarak, falkon tüplerinde farklı pH’larda hazırlanmış olan 10 mM PBS tamponunda Cu (8×10^{-4} M, 0.35 ml) ile vorteksleme işlemine maruz bırakılmıştır. Elde edilen karışımın karanlık bir ortamda inkübasyonundan sonra (3 gün, 4 °C) falkon tüplerinin dibinde oluşan mavi renkli çözeltiler santrifüjlendi (10000 rpm, 10 dk). Daha sonra distile su ile yıkanarak, etüvde (1 gece, 70 °C) kurutulmuştur. (Koca ve ark., 2020; Ata vd., 2024).

3.2. Nanomalzemelerin Karakterizasyonu

Sentez sürecinin tamamlandıktan sonra her iki örnek ayrı ayrı kurutuldu. Daha sonra *Cladonia subulata* ve *C. rangiformis* özütleri ile sentezlenen Cu çiçek sekilli hibrit nanoyapıların karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon testleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (ERÜTAUM) gerçekleştirilmiş olup Çizelge 3.1'de detaylı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların karakterizasyonda kullanılan analizler

Analiz	Kullanım amacı
FE-SEM	Morfolojilerinin belirlenmesi
FT-IR	Sentezde rol alan grupların varlığının tespiti

3.3 Hücre Kültürü ve MTT Testi

Çalışmamızda Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yetiştirilen kolon kanseri hücreleri (DLD-1) kullanıldı. Çalışmada, hücreler inverted tip ışık mikroskobu altında kontrol edildi ve daha sonra yeterli miktarda pasajlandı. 75 cm²'lik flasklarda analiz için hazırlandı. Flask yüzeyindeki yapışkan hücreler 2 kez fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı ve ardından 1X Tripsin/EDTA solüsyonu ile kaldırıldı. Besiyeri ile nötralize edildikten sonra falkon tüplerine aktararak 1600 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant atıldı ve üzerine 1 ml besiyeri ilave edilip sayıma hazır bir duruma getirildi. Hazırlanan süspanse hücre solüsyonunun 10 µl'si thoma lamı kullanılarak 10 saniye boyandı. Sayımı için ışık mikroskobundan yararlanıldı. Kuyucuk başına her bir plaka için 5x10³ hücre/ 100 µl besiyeri olacak şekilde hücreler besiyeri ile seyreltildi ve plakaya ekildi (Yapılan analizler için en çok tabanı düz 96 kuyucuklu, tek kullanımlık ve steril kapaklı plakalar kullanıldı). Ardından % 5'lik CO₂ ortamında 37 °C'de tutunması için inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre besiyeri 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 µg/ml Cu NP solüsyonu içeren besiyeri ile yer değiştirildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda her bir kuyuya ışıktan korunarak MTT çözeltisinden (5 mg/ml PBS içinde çözülüp filtrelenen MTT solüsyonu) ilave edildi ve 3 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücrelerin besiyerleri tamamen çekildi. 100 µl DMSO ilave edildikten sonra plaka 15 dakika boyunca formazan kristallerinin çözünmesi için karanlıkta çalkalandı. ELİSA (Thermo-

Multiskan® GO) plaka okuyucu cihazında 570 nm dalga boyunda okutulduktan sonra hücre canlılığı, aşağıdaki formülle Microsoft Excel yazılımı kullanılarak ölçüldü: Canlılık (%) = ortalama deneysel (optik yoğunluk) OD değeri / ortalama kontrol OD değeri x % 100. MTT testinin sonuçları için SPSS 25.0 (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL) kullanılarak tek yönlü ANOVA (Tukey) gerçekleştirildi.

3.4. Moleküler Biyolojik Çalışmalar

Kanser araştırmalarında, liken kaynaklı biyolojik sentezle elde edilen nanopartiküller, sitotoksik ve hücre seçici özellikleri sayesinde moleküler biyoloji temelli çalışmalarda giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu nanopartiküllerin, kanser hücre hatları üzerinde gen ekspresyon düzeylerini modüle edebildiği; özellikle proliferasyon, DNA hasarı onarımı ve hücre sinyalleme yolları ile ilişkili genlerde anlamlı değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. qPCR, Western blot ve floresan mikroskopi gibi tekniklerle desteklenen bu çalışmalar, liken bazlı nanoparçacıkların yalnızca fiziksel değil, aynı zamanda genetik düzeyde de terapötik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, geleneksel kemoterapötik ajanlara kıyasla daha az toksisite profili sergilemeleri, bu biyojenik nanoyapıları kanser tedavisinde moleküler hedeflemeye yönelik yenilikçi araçlar haline getirmektedir.

3.4.1 Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla; kontrol ve konsantrasyon gruplarından total RNA ekstraksiyonu, üretici tarafından önerilen prosedürlere göre Qiagen (Kat. No/ID: 74034) reaktifinden RNeasy Plus Kitine göre yapılmıştır. Daha sonra Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, ABD) ve % 1,0 agaroz jel elektroforezi kullanılarak RNA miktarı ve saflığı belirlenmiştir. İzole edilen tüm RNA örnekleri oluşabilecek DNA kontaminasyonuna karşı DNase enzimi (Thermo Scientific EN0521) ile muameleye tabii tutulmuştur (Bölükbaşı, 2022).

İzole edilen tek zincirli total RNA'ların komplementer zincirleri, oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak, "QuantiTec® Reverse Transcriptase Kit Qiagen, Germany" ile sentezlenmiş ve cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA sentezi için 42°C'de 1 saat inkübasyon sonrası enzimi inhibe etmek için 70°C'de 5 dakika bekletilmiştir. *CYP11A1*

ve *BCL-2* gen bölgelerinin uzun olması nedeni ile anchored-oligo(dT)18 primeri kullanılmıştır.

3.4.2 qRT-PCR analizleri

Temizlik geni olarak β -*aktin* primerleri ve bu bölgelere özel bu çalışmada kullanılan *CYP1A1* ve *BCL-2* genleri, gen bankasındaki (NCBI; Ulusal Biyoteknoloji Merkezi) DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinin bilgileri kullanılarak tasarlanmıştır. Bu genler ve bu çalışma için tasarlanan primer dizileri hakkındaki bilgiler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan genlere yönelik tasarlanan Real-Time PCR primer dizileri

Genler/ Primerler	Uzunluk	Gen Bank No	Sekans (5’-3’)	T _m (°C)
<i>CYP1A1</i>	2586 bp	BC_023019.1	F:GAACATCCCTATTCTTCGGGG R:GCCATGTGGCCCTTCTGTC	58-60 °C
<i>BCL-2a</i>	6492 bp	NM_000633.2	F:CCGTGGGATGCCTTTGACC R:CGGAAACTGAGCAGAGTGGT	58-60 °C
β - <i>Actin</i>	1812 bp	NM_001101.5	F:GGAGGCACCCAGCACTTA R:GCCGATCCACACGGAGTTGA	58-60 °C

cdNA sentezinin ardından Pico Real Time (Thermo) aracılığıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak Real-Time PCR uygulamaları yapıldı. Elde edilen nanopartiküllerin kanserle ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla *CYP1A1* ve *BCL-2*’nin mRNA seviyeleri qPCR yöntemiyle belirlendi. PCR koşulları, 95°C’de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, (40 döngü) 95°C’de 15 saniye, 60°C’de 25 saniye, 72°C’de 30 saniye ve artan sıcaklıkla 52 ila 95°C’lik bir erime analizinden oluşuyordu (sıcaklık 0,5°C-1 dk.). qRT-PCR analizi, elde edilen optimal koşulları kullanan üç teknik kopyadan oluşan üç biyolojik kopya içermektedir.

3.4.3 qPCR sonuçlarının normalizasyonu ve istatistiksel analizi

Ct değeri olarak belirlenen gen ekspresyon sonuçları, housekeeping gen olarak çalışmada kullanılan β -*Actin* ve kontrol koşulları dikkate alınarak normalize edildi (Livak ve Schmittgen, 2001). MTT analizinde en etkili konsantrasyonun belirlenmesi için *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin Real-Time PCR reaksiyonu eş zamanlı izlenerek pik profilleri kaydedildi.

Her numunenin Ct değerleri bu tepe profilleri ile belirlendi. Sentezlenen gen ürünlerinin mRNA seviyeleri, elde edilen bu Ct değerleri ve Erime Eğrisi Analizi ile kantitatif olarak belirlendi (Kubista ve ark. 2006). Elde edilen veriler Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemine göre normalleştirildi (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu verilerin ortalaması, standart sapması, standart hatası ve istatistiksel anlamlılığı SPSS 25.0 for Windows (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL) istatistik programı kullanılarak hesaplandı.



4. BULGULAR

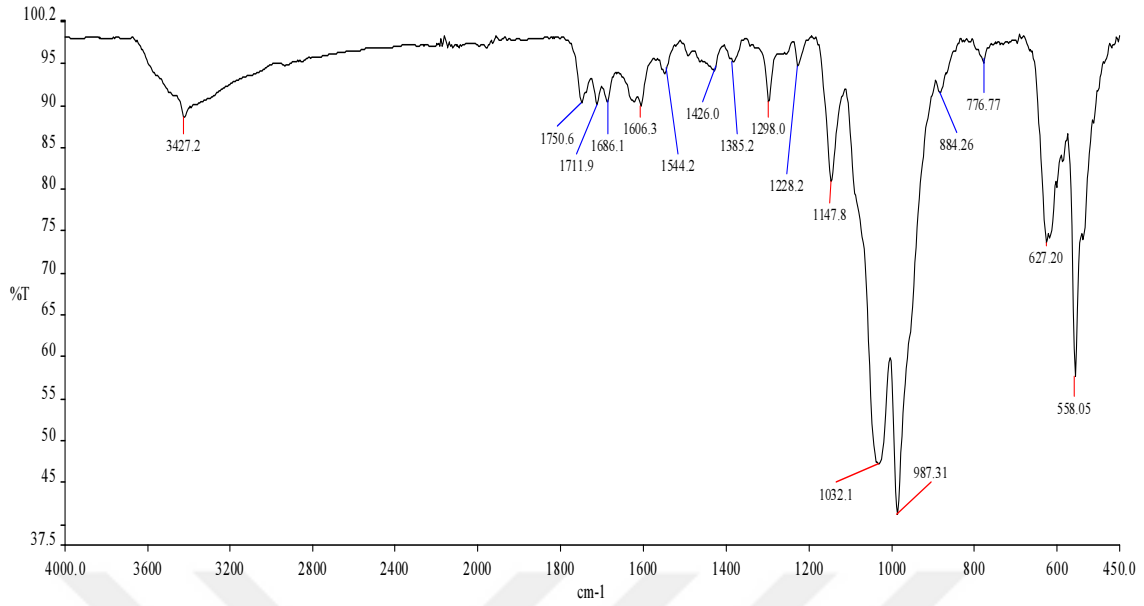
Bu bölümde, farklı *Cladonia* (L.) liken türlerinden biyolojik sentez yoluyla elde edilen çiçek şekilli hibrit nanoyapıların karakterizasyonu ve DLD-1 kolon kanseri hücre hattı üzerindeki biyolojik etkilerine ait bulgular sunulmuştur. MTT analizi sonuçlarına göre, nanoyapıların hücre canlılığını doz bağımlı olarak azalttığı ve yüksek konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde sitotoksikite oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, sağlıklı CCD-18Co hücre hattında gözlenen minimal toksisite, hibrit yapının seçici antikanser etkisine işaret etmektedir. Gerçek zamanlı PCR ile yapılan gen ekspresyon analizleri sonucunda, kanserle ilişkili bazı genlerin aşağı ve yukarı yönlü düzenlendiği belirlenmiş; bu moleküler değişimlerin, nanoyapıların terapötik potansiyelini destekleyici nitelikte olduğu değerlendirilmiştir.

4.1 Sentezi Yapılan Nanoyapıların Karakterizasyon Sonuçları

Farklı *Cladonia* (L.) liken türlerinden biyolojik sentez yoluyla elde edilen çiçek şekilli hibrit nanoyapılar, morfolojik ve yapısal özellikleri açısından çeşitli karakterizasyon teknikleriyle incelenmiştir. SEM analizleri, nanoyapıların belirgin çiçek benzeri morfolojilere sahip olduğunu ortaya koyarken, FTIR analizleri, liken ekstraktlarında yer alan fenolik ve karbonil gruplarının nanoparçacık yüzeyine bağlanarak indirgeme ve stabilizasyon görevini üstlendiğini doğrulamıştır. Bu karakterizasyon sonuçları, *Cladonia* türlerinin biyojenik nanoyapı sentezinde etkili ve fonksiyonel biyolojik ajanlar olduğunu göstermektedir.

4.1.1 Fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) analiz sonuçları

Sentezlenen Cu-çiçek şekilli hibrit nanoyapıların fonksiyonel gruplarını belirlemek için Fourier Dönüşümlü Infrared (FT-IR) spektroskopisi (PerkinElmer Spectrum Two FT-IR) kullanılmıştır. Numuneler potasyum bromür (KBr) ile karıştırılarak ince bir disk haline getirilmiş ve 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında analiz edilmiştir. Elde edilen spektrumlar, nanoyapıların yüzeyinde yer alan organik grupların ve indirgeme/stabilizasyon süreçlerinde yer alan moleküler etkileşimlerin belirlenmesi için yorumlanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapılara ait karakterizasyon (FT-IR) sonuçları

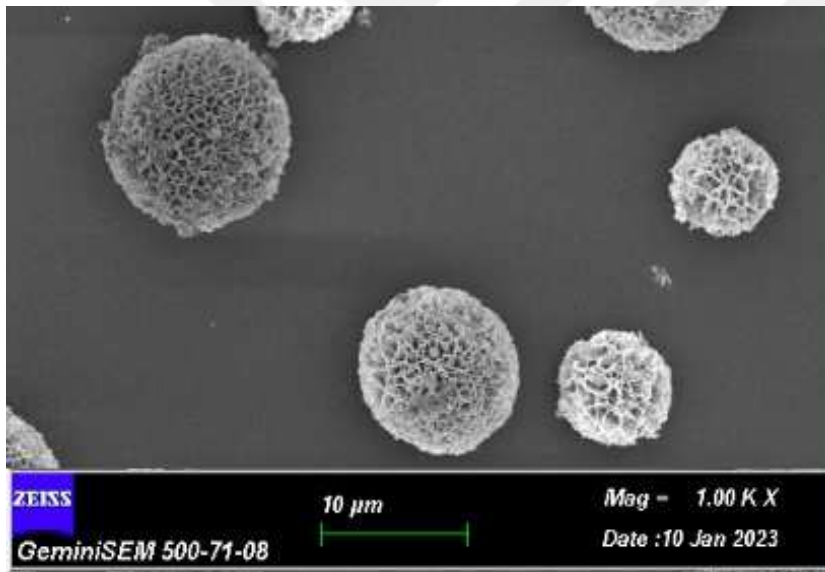
FT-IR analizi, sentezlenen bileşikteki organik fonksiyonel grupların varlığını doğrulamıştır (Şekil 4.1). 3427 cm^{-1} piki alkol (-OH) gruplarını, $1750\text{-}1385\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler ester (C=O), karboksilik asit (C=O), primer amid (C=O), amin (N-H), nitro (N=O), alkol (O-H) ve fenol (O-H) gruplarını göstermektedir. 1298 ve 1228 cm^{-1} pikleri aromatik halkalarla, 1147 cm^{-1} piki amin (C-N) ile ilişkilendirilmiştir. $1032\text{-}558\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler, primer fosfat kristallerinin (PO_4^{3-}) varlığını ve PBS tamponunda gerçekleşen sentezi doğrulamaktadır.

Çalışmada Cu-çiçek şekilli hibrit nanoyapıların FT-IR analizi, yapıda alkol (-OH), ester (C=O), karboksilik asit (C=O), primer amid (C=O), amin (N-H), nitro (N-O), alkol (O-H) ve fenol (O-H) gibi organik fonksiyonel grupların varlığını doğrulamıştır. Bu gruplar, biyosentetik nanopartiküllerin anti-mikrobiyal ve antikanser potansiyelini desteklemektedir (Nabi vd., 2018). Sentez sırasında kullanılan PBS tamponu, primer fosfat gruplarının varlığını doğrulamış ve optimal pH (7) ile su ortamı, Cu-çiçek şekilli hibrit nanoyapıların stabil ve etkin morfolojik özellikler kazanmasını sağlamıştır. Bu koşullarda sentezlenen nanoyapılar, stabiliteleri nedeniyle sonraki aşamalarda tercih edilmiştir.

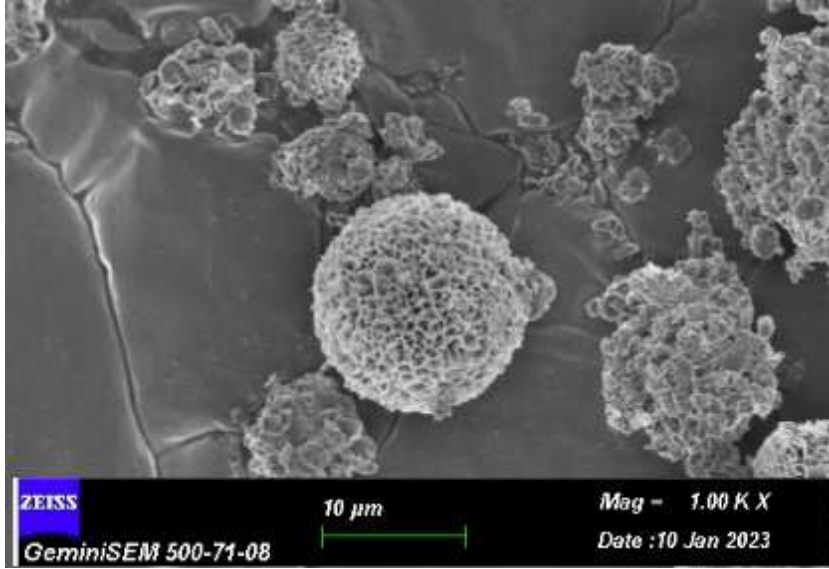
4.1.2 Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) analiz sonuçları

Nanoyapıların morfolojik özellikleri ve yüzey yapısı, Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM; Zeiss Sigma 500) ile incelenmiştir. Analiz öncesinde numuneler, yüksek çözünürlük elde etmek amacıyla ince bir altın tabakası ile kaplanmıştır. Görüntüler 2-5 kV hızlandırma voltajında alınmış ve hibrit nanoyapıların çiçek benzeri morfolojisi detaylı olarak karakterize edilmiştir.

Cladonia (L.) cinsine ait farklı *Cladonia subulata* (L.) ve *Cladonia rangiformis* (L.) liken türlerinden biyosentezi gerçekleştirilen Cu-çiçek şekilli hibrit nanoyapıların morfolojik yapıları Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ile belirlenmiştir. Elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapıları FE-SEM sonuçları Şekil 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.2. *Cladonia subulata* liken özütüyle biyolojik sentez yoluyla elde edilen bakır bazlı çiçek şekilli hibrit nanopartikülün FE-SEM görüntüsü



Şekil 4.3. *Cladonia rangiformis* liken özütüyle biyolojik sentez yoluyla elde edilen bakır bazlı çiçek şekilli hibrit nanopartikülün FE-SEM görüntüsü

FE-SEM analizleri, sentezlenen Cu-çiçek şekilli hibrit nanoyapıların düzgün bir morfolojiye ve geniş bir yüzey alanına sahip olduğunu göstermiştir. Çiçek benzeri yapı, katalitik aktiviteler gibi uygulamalarda daha fazla reaktif alan sunan yüksek yüzey alanı sağlamaktadır.

4.2 MTT Analiz Sonuçları

Farklı *Cladonia* (L.) liken türlerinden biyolojik olarak sentezlenen çiçek şekilli hibrit nanoyapıların kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkileri, MTT analizi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. DLD-1 kolon kanseri hücre hattında yapılan doz-cevap deneyleri sonucunda, nanoyapıların hücre canlılığını doza bağlı olarak anlamlı düzeyde azalttığı gözlemlenmiştir. Özellikle belirli konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu baskıladığı ve metabolik aktiviteyi düşürdüğü belirlenmiştir. Bu bulgular, biyolojik kaynaklı hibrit nanoyapıların antikanser potansiyel taşıdığını ve kolon kanseri tedavisine yönelik alternatif biyonanoteknolojik yaklaşımlar geliştirilmesinde değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

4.2.1 *Cladonia subulata*'dan elde edilen MTT sonuçları

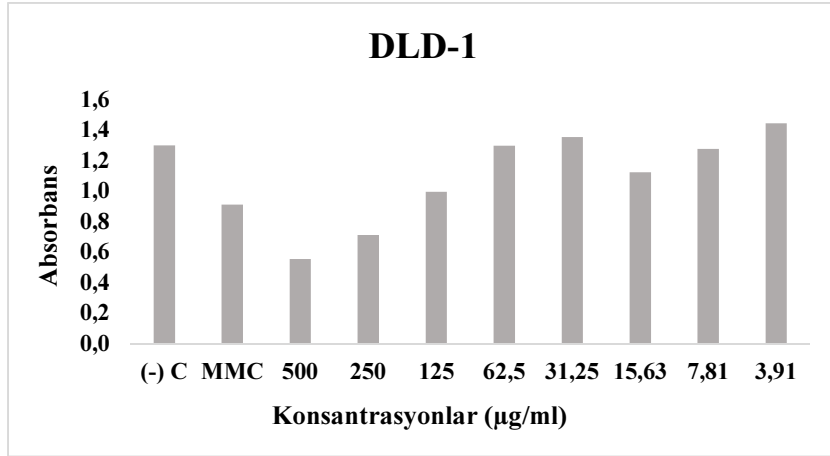
C. subulata likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulamasının DLD-1 ve CCD18-Co hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi sonucu; Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılık eğrisi belirlenmiş ve % 50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri hesaplanmıştır. (Sitotoksite=test absorbans değeri/kontrol absorbans değeri ortalama $\times$ 100). Deneyler üçer kez tekrarlanmıştır ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. DLD-1 ve CCD18-Co Hücre Hatlarında Cu-Çiçek Şekli Nanopartikül Uygulamalarının MTT Sonuçları

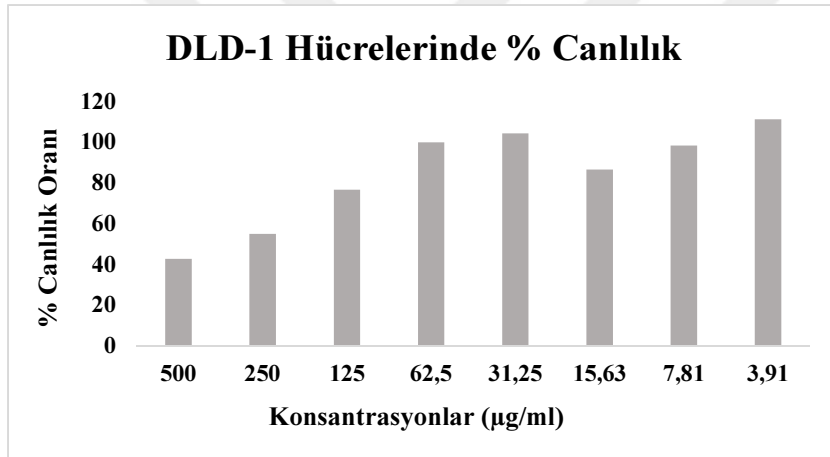
DLD-1				CCD18-Co			
Konsantrasyon ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Absorbans	% Canlılık	IC50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Konsantrasyon ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Absorbans	% Canlılık	IC50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Kontrol	1,380	100	345,397	Kontrol	1,149	100	431,649
3,91	1,441	110,994		3,91	1,193	96,087	
7,81	1,274	98,163		7,81	1,068	86,066	
15,63	1,121	86,313		15,63	1,046	84,304	
31,25	1,353	104,184		31,25	1,143	92,103	
62,5	1,295	99,723		62,5	1,007	81,098	
125	0,993	76,504		125	0,943	75,968	
250	0,712	54,807		250	0,788	63,524	
500	0,553	42,602		500	0,616	49,631	

Bu sonuçlara göre, *C. subulata* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulamasının DLD-1 ve CCD18-Co hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. DLD-1 hücrelerinde elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün IC50 dozu 345,397 $\mu\text{g/ml}$ iken CCD18-Co hücrelerinde IC50 dozu 431,649 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bunun için [Test Maddesi Absorbans(ortalama) / Kontrol Absorbans (ortalama)] $\times$ 100 formülü kullanılmıştır.

Cladonia subulata likeninden biyolojik sentez yoluyla elde edilen bakır bazlı hibrit nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarda ayarlanarak, kolon kanseri hücreleri (DLD-1) üzerindeki sitotoksik etkileri ve buna bağlı elde edilen absorbans değerleri ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir.

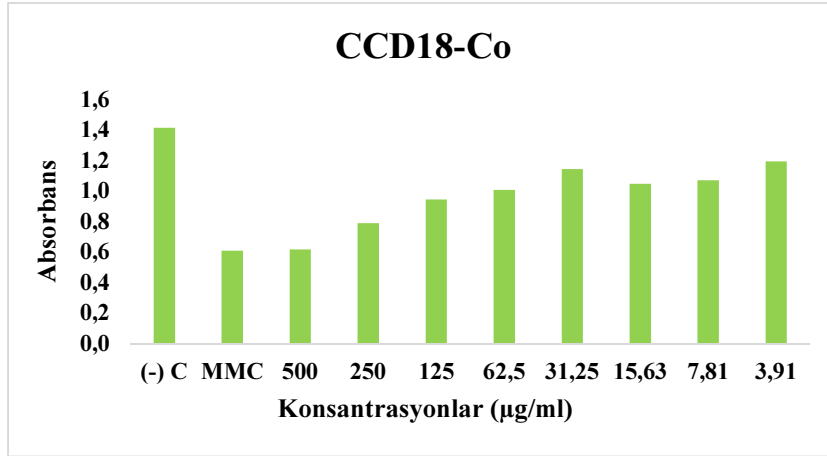


Şekil 4.4. Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda kolon kanseri (DLD-1) hücrelerinin (5×10^3 hücre) absorbans verilerinin konsantrasyona bağlı değişimi

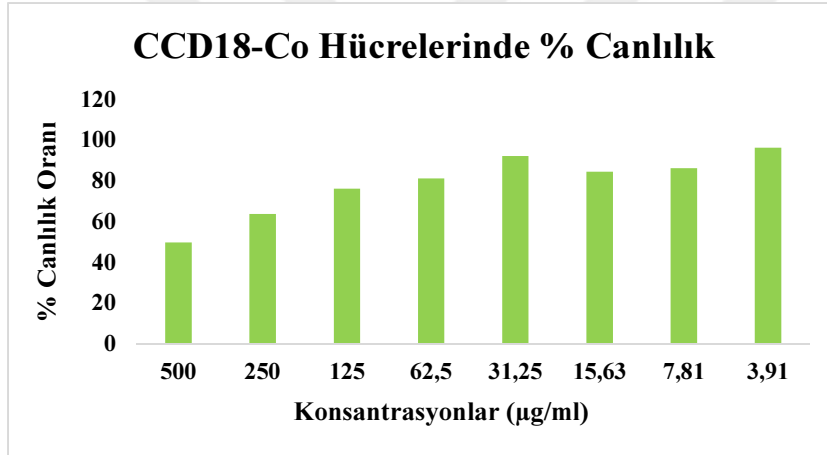


Şekil 4.5. Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda kolon kanseri (DLD-1) hücrelerinde (5×10^3 hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

Cladonia subulata likeninden biyolojik sentez yoluyla elde edilen bakır bazlı hibrit nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarda ayarlanarak, sağlıklı kolon hücreleri (CCD18-Co) üzerindeki sitotoksik etkileri ve buna bağlı elde edilen % canlılık değerleri ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücrelerinin (5×10^3 hücre) absorbans verilerinin konsantrasyona bağlı değişimi



Şekil 4.7. Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücrelerinde (5×10^3 hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

4.2.2 *Cladonia rangiformis*'den elde edilen MTT sonuçları

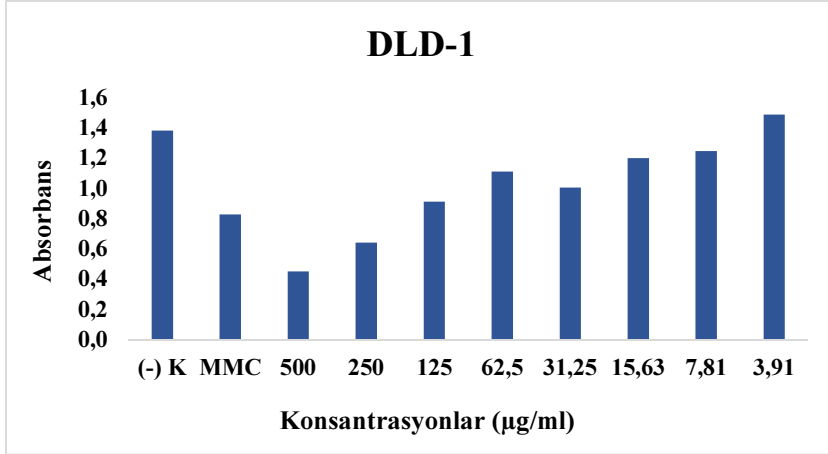
C. rangiformis likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulamasının DLD-1 ve CCD18-Co hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi sonucu; Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılık eğrisi belirlenmiş ve % 50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri hesaplanmıştır. (Sitotoksite=test absorbans değeri/kontrol absorbans değeri ortalaması $\times 100$). Deneyler üçer kez tekrarlanmıştır ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. DLD-1 ve CCD18-Co Hücre Hatlarında Cu-Çiçek Şekli Nanopartikül Uygulamalarının MTT Sonuçları

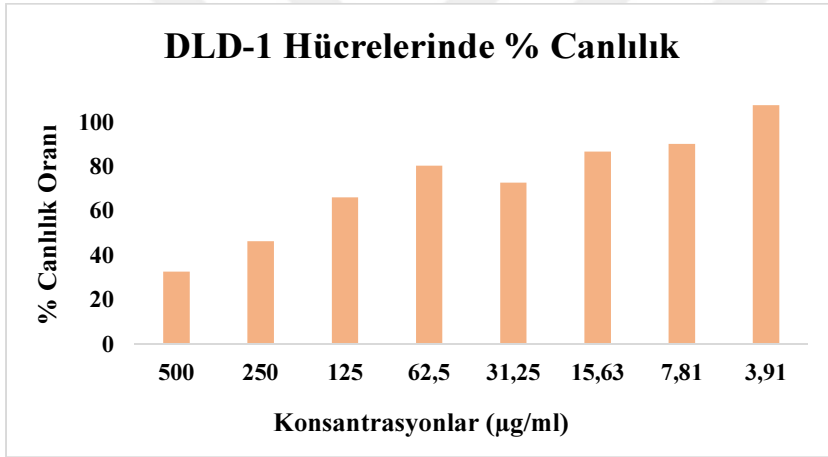
DLD-1				CCD18-Co			
Konsantrasyon ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Absorbans	% Canlılık	IC50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Konsantrasyon ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Absorbans	% Canlılık	IC50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Kontrol	1,380	100	271,627	Kontrol	1,149	100	294,104
3,91	1,485	107,597		3,91	1,055	91,782	
7,81	1,244	90,121		7,81	0,925	80,448	
15,63	1,197	86,704		15,63	0,951	82,701	
31,25	1,003	72,649		31,25	0,967	84,157	
62,5	1,108	80,284		62,5	0,884	76,915	
125	0,912	66,046		125	0,680	59,187	
250	0,640	46,347		250	0,505	43,894	
500	0,450	32,610		500	0,542	47,187	

Bu sonuçlara göre, *C. rangiformis* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulamasının DLD-1 ve CCD18-Co hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. DLD-1 hücrelerinde elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün IC50 dozu 271,627 $\mu\text{g/ml}$ iken CCD18-Co hücrelerinde IC50 dozu 294,104 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bunun için $[\text{Test Maddesi Absorbans(ortalama)} / \text{Kontrol Absorbans (ortalama)}] \times 100$ formülü kullanılmıştır.

Cladonia rangiformis likeninden biyolojik sentez yoluyla elde edilen bakır bazlı hibrit nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarda ayarlanarak, kolon kanseri hücreleri (DLD-1) üzerindeki sitotoksik etkileri ve buna bağlı elde edilen absorbans değerleri ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir.

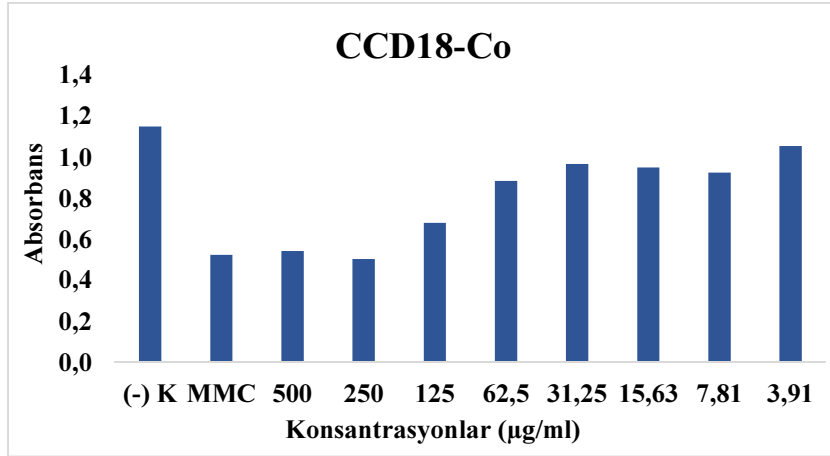


Şekil 4.8. Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda kolon kanseri (DLD-1) hücrelerinin (5×10^3 hücre) absorbans verilerinin konsantrasyona bağlı değişimi

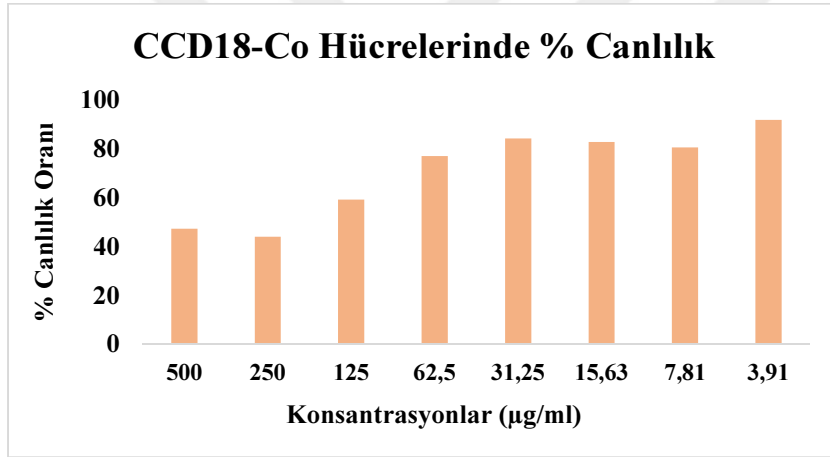


Şekil 4.9. Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda kolon kanseri (DLD-1) hücrelerinde (5×10^3 hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

Cladonia rangiformis likeninden biyolojik sentez yoluyla elde edilen bakır bazlı hibrit nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarda ayarlanarak, sağlıklı kolon hücreleri (CCD18-Co) üzerindeki sitotoksik etkileri ve buna bağlı elde edilen % canlılık değerleri ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücrelerinin (5×10^3 hücre) absorbans verilerinin konsantrasyona bağlı değişimi

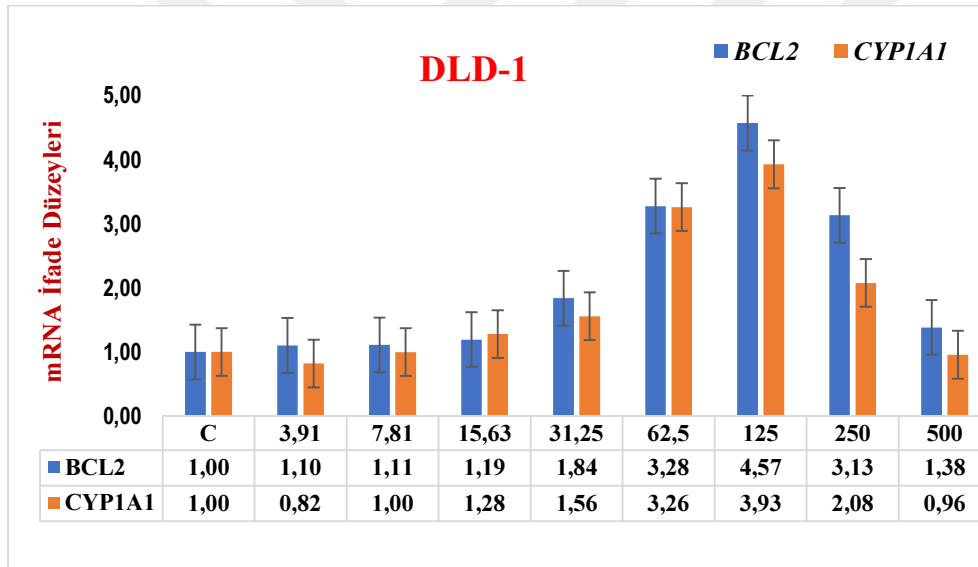


Şekil 4.11. Cu-çiçek şekilli nanopartikül'ün 24 saatlik uygulaması sonucunda sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücrelerinde (5×10^3 hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

4.3 Moleküler Biyolojik Analiz Sonuçları

Farklı *Cladonia* (L.) liken türlerinden biyolojik yöntemlerle sentezlenen çiçek şekilli hibrit nanoyapıların kolon kanseri hücreleri üzerindeki moleküler etkileri, gen ekspresyon düzeyinde gerçekleştirilen analizlerle değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile yapılan çalışmalar sonucunda, hücre çoğalması, DNA hasar yanıtı ve hücresel stresle ilişkili bazı genlerde anlamlı düzeyde aşağı veya yukarı yönlü ekspresyon değişimleri saptanmıştır. Bu değişiklikler, nanoyapıların yalnızca hücre canlılığını azaltmakla kalmayıp aynı zamanda kanser hücrelerinin moleküler düzeneklerini de etkilediğini göstermektedir. Elde edilen

DLD-1 hücrelerinde; *BCL-2* gen ifade düzeyinde değişim kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 4,57 katlık bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu artış 62,50 ng/ml’ de 3,28 kat ($p<0,05$), 250 ng/ml’ de 3,13 kat ($p<0,05$) ile belirlenen en yüksek artış olarak tespit edilmiştir (Table 3). *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,93 katlık bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). 62,50 ve 250 ng/ml konsantrasyonda sırasıyla 3,26 ve 2,08 katlık değişim belirlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak 500 ng/ml’ de 0,96 kat ile yeniden ifade düzeyi düşmüştür. bu düzey 125 ng/ml’den sonra konsantrasyon arttıkça kademeli olarak azalmıştır. *Cladonia subulata* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması yapılmış DLD-1 hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin belirlenen doz konsantrasyonuna bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

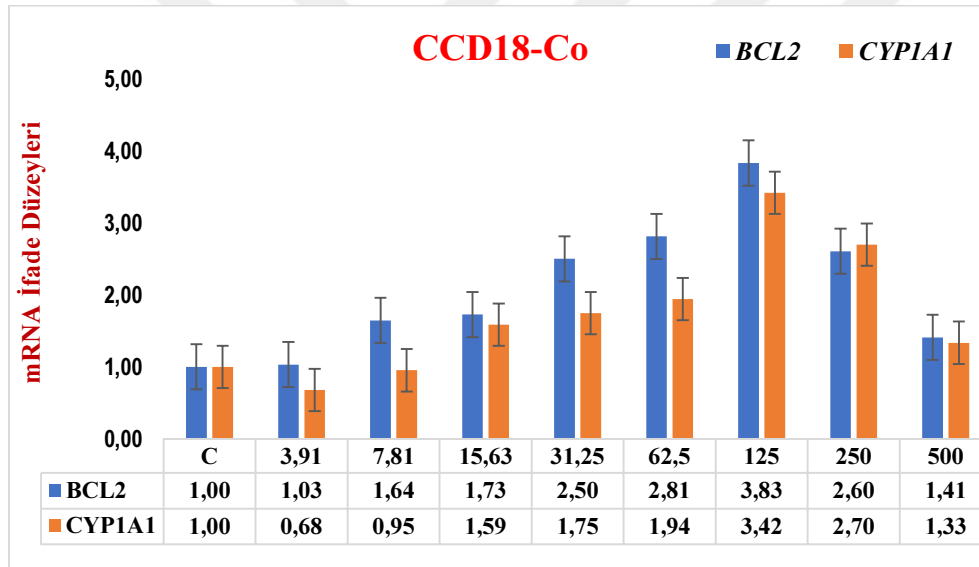


Şekil 4.12. Belirlenen dozlarda *Cladonia subulata* likeninden elde edilen Cu-çiçek şeklindeki nanopartiküller ile tedavi edilen DLD-1 (kolon kanseri) hücre hatlarında *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler

Sonuçlar göstermektedir ki, DLD-1 hücrelerinde *Cladonia subulata* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması bağlı olarak *BCL-2* geni; 125 µg/ml konsantrasyonunda en yüksek seviyede eksprese olmuştur. Böylelikle 62,50, 125 ve 250 ng/ml konsantrasyonlarda kontrol ve diğer konsantrasyonlara kıyasla daha fazla eksprese olmuş ve uygulama sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* geninin eksprese düzeyini arttırarak antikanser özellik göstermiştir.

CYP1A1 geni ise, yine 125 µg/ml konsantrasyon uygulamasında 3,93 kat ile en yüksek eksprese seviyesine ulaşmış ve antikanser özellik göstermiştir.

CCD18-Co hücrelerinde ise; *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 µg/ml dozunda yaklaşık 3,83 katlık artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 µg/ml dozunda yaklaşık 3,42 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 62,50, 125 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarda en yüksek seviyelere ulaşmıştır. En düşük düzey ise 0,68 kat ile 3.91 µg/ml konsantrasyonda tespit edilmiştir. *Cladonia subulata* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması yapılmış CCD18-Co hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin belirlenen doz konsantrasyonuna bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13 Belirlenen dozlarda *Cladonia subulata* likeninden elde edilen Cu-çiçek şeklindeki nanopartiküller ile tedavi edilen CCD18-Co (sağlıklı normal kolon) hücre hatlarında *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler

Sonuçlar değerlendirildiğinde, CCD18-Co hücrelerinde *Cladonia subulata* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması özellikle 31,25-250 µg/ml konsantrasyon aralığında *BCL-2* ve *CYP1A1* genlerinin ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artmıştır. Böylelikle nanopartikül uygulaması sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında koruyucu etkisi olan *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini arttırarak antikanser özellik göstermiştir.

4.3.2 *Cladonia rangiformis*'den elde edilen gen ekspresyon verileri

Cladonia rangiformis likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulanan DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinde konsantrasyona bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan β -Actin geni housekeeping gen olarak kullanılmış ve ct değeri olarak belirlenen gen ifade sonuçları bu şekilde normalize edilmiştir. *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin Real-Time PCR reaksiyonu aynı anda izlenmiş ve pik profilleri kaydedilmiştir. Her örneğin Ct değerleri bu pik profillerine göre belirlenmiştir. Sentezlenen gen ürünlerinin mRNA seviyeleri bu elde edilen Ct değerleri ve Melting Curve Analizi ile nicel olarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre normalize edilmiştir. Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel analizi SPSS 25.0 istatistiksel programı (IBM SPSS) kullanılarak hesaplanmıştır. Normalizasyonu yapılmış gen ifade verilerinin sonuçlarına göre, *Cladonia rangiformis* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulanan DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinde konsantrasyona bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin her birinin ifade düzeyindeki değişiklikler Çizelge 4.4'te verilmiştir.

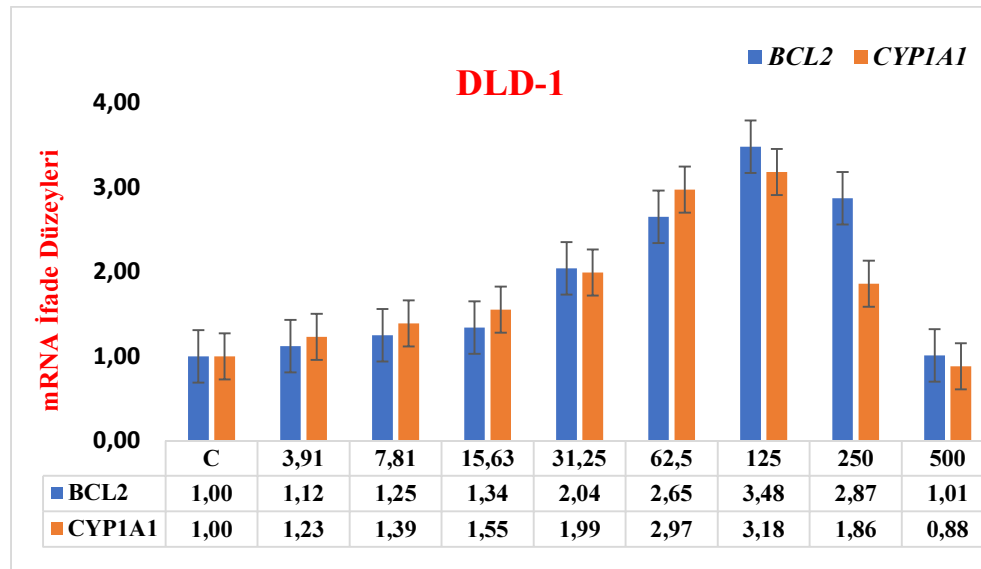
Çizelge 4.4. DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinin normalizasyonu sonucu elde edilen *CYP1A1* ve *BCL-2* gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart sapması ve standart hatası

	Ortalama				Standart Sapma				Standart Hata			
	<i>BCL-2</i>		<i>CYP1A1</i>		<i>BCL-2</i>		<i>CYP1A1</i>		<i>BCL-2</i>		<i>CYP1A1</i>	
Kon.(µg/ml)	DLD-1	CCD18-Co	DLD-1	CCD18-Co	DLD-1	CCD18-Co	DLD-1	CCD18-Co	DLD-1	CCD18-Co	DLD-1	CCD18-Co
K	1,00	1,00	1,00	1,00	0,318	0,573	0,164	0,115	0,184	0,331	0,095	0,067
3,91	1,12	0,95	1,23	1,05	0,448	0,955	0,311	0,459	0,259	0,551	0,179	0,265
7,81	1,25	1,18	1,39	1,28	0,674	1,232	1,060	0,110	0,389	0,711	0,612	0,063
15,63	1,34	1,63	1,55	1,78	0,442	1,050	0,041	0,896	0,255	0,606	0,024	0,517
31,25	2,04	1,95	1,99	2,09	0,792	2,386	0,181	1,012	0,457	1,378	0,104	0,584
62,5	2,65	2,97	2,97	2,83	2,173	1,513	0,324	1,539	1,254	0,873	0,187	0,889
125	3,48	3,67	3,18	2,47	1,186	0,957	0,409	1,102	0,685	0,553	0,236	0,636
250	2,87	2,22	1,86	1,58	0,107	1,809	0,034	0,008	0,062	1,045	0,020	0,005
500	1,01	1,10	0,88	1,04	0,318	0,573	0,164	0,115	0,184	0,331	0,095	0,067
Kon: Konsantrasyon, K: Kontrol												

Cladonia rangiformis likeninden biyolojik yöntemle sentezlenen bakır-nano-flower kompozit malzemenin, DLD-1 kolon kanseri hücreleri ve CCD18-Co sağlıklı kolon

hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kanser hücreleri üzerindeki etki, özellikle kanserle ilişkili *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimler aracılığıyla değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250 ve 500 µg/ml) uygulama yapılan nanopartiküllerin etkisi, 24 saatlik inkübasyon sonucunda analiz edilmiştir.

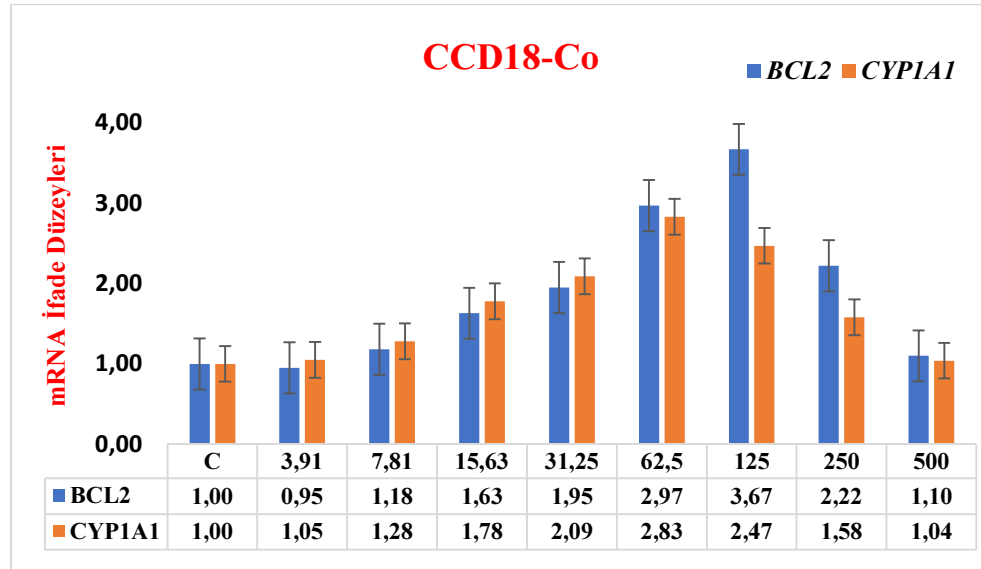
DLD-1 hücrelerinde; *BCL-2* gen ifade düzeyinde değişim kontrol grubuna göre 125 µg/ml dozunda yaklaşık 3,48 katlık ile belirlenen en yüksek artış olarak tespit edilmiştir. Bu artış 62,50 µg/ml’ de 2,65 kat ($p<0,05$), 250 µg/ml’ de ise 2,87 katlık bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 µg/ml dozunda yaklaşık 3,18 katlık bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). 62,50 ve 250 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla 2,97 ve 1,86 katlık değişim belirlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak 500 µg/ml’ de 0,88 kat ile yeniden ifade düzeyi düşmüştür. Bu düzey 125 µg/ml’den sonra konsantrasyon arttıkça kademeli olarak azalmıştır. *Cladonia rangiformis* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması yapılmış DLD-1 hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin belirlenen doz konsantrasyonuna bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



Şekil 4.14 *Cladonia rangiformis* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması yapılmış DLD-1 (kolon kanseri) hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler

CCD18-Co hücrelerinde ise; *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 µg/ml dozunda yaklaşık 3,67 katlık artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte *CYP1A1* gen ifade

düzeyinde kontrol grubuna göre 125 µg/ml dozunda yaklaşık 2,47 katlık bir artış tespit edilmiştir. En düşük düzey ise 0,68 kat ile 500 µg/ml konsantrasyonda tespit edilmiştir. *Cladonia rangiformis* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması yapılmış CCD18-Co hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin belirlenen doz konsantrasyonuna bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15 *Cladonia rangiformis* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması yapılmış CCD18-Co (sağlıklı normal hücre) hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler

Sonuçlar değerlendirildiğinde, CCD18-Co hücrelerinde *Cladonia rangiformis* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması özellikle 31,25-250 µg/ml konsantrasyon aralığında *BCL-2* ve *CYP1A1* genlerinin ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artmıştır. Böylelikle nanopartikül uygulaması sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında koruyucu etkisi olan *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini arttırarak antikanser özellik göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *Cladonia subulata* ve *Cladonia rangiformis* liken türlerinden biyosentez yoluyla elde edilen Cu-çiçek şekilli hibrit nanopartiküller, özellikle kolon kanseri hücre hattı (DLD-1) ve sağlıklı kolon hücre hattı (CCD18-Co) üzerinde gösterdikleri biyolojik etkiler açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, bu tür nanopartiküllerin antikanser potansiyeline ve seçici toksisite özelliklerine dikkat çekmektedir. Çalışmada kullanılan FE-SEM ve F-TIR analizleri, nanopartiküllerin çiçek benzeri morfolojik yapılarının detaylı görüntülerini sunmuştur.

Araştırmanın sitotoksikite sonuçlarında ise, Cu-çiçek şekilli hibrit nanopartiküllerin kolon kanseri hücreleri (DLD-1) üzerinde sağlıklı hücelere (CCD18-Co) kıyasla daha güçlü bir baskılayıcı etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuç, nanopartiküllerin antikanser etkisinin seçici olduğu hipotezini desteklemektedir.

MTT analizlerinden elde edilen IC₅₀ değerleri, *Cladonia rangiformis* türünden elde edilen nanopartiküllerin DLD-1 hücrelerinde 271,627 µg/ml, CCD18-Co hücrelerinde ise 294,104 µg/ml olduğunu göstermiştir. *Cladonia subulata* liken türünden elde edilen nanopartiküller ise DLD-1 hücrelerinde 345,397 µg/ml IC₅₀ değerleri sergilemiştir. Bu veriler, farklı liken türlerinden elde edilen nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerinde belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır. Sağlıklı hücreler üzerinde gözlemlenen düşük sitotoksik etkinin, nanopartiküllerin biyoyumluluğunu ve güvenilirliğini destekler nitelikte olduğu görülmektedir.

Tez çalışmasında *CYP1A1* ve *BCL-2* genleri üzerindeki ekspresyon değişiklikleri incelenmiş ve özellikle 125 µg/ml konsantrasyonda DLD-1 hücrelerinde *BCL-2* gen ekspresyonunda *Cladonia subulata* için 4,57 kat ve *Cladonia rangiformis* için 3,48 kat artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde *CYP1A1* gen ekspresyonunda *Cladonia subulata*'da 3,93 kat ve *Cladonia rangiformis*'te 3,18 kat artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, nanopartiküllerin apoptotik süreçleri tetikleyebileceğini ve kanser hücreleri üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışma *Cladonia* türlerinden elde edilen Cu-çiçek şekilli hibrit nanopartiküllerin biyolojik aktivitelerini ortaya koymakta ve antikanser tedavilerde umut vaat eden bir araç olduğunu göstermektedir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından düzenlenen son verilere bakıldığında, yeni tanı alan kanser vakalarının ortalama sayısı yılda 14 milyonu aşmaktadır ve % 60'dan fazlası ölüme neden olmaktadır (8,8milyon) (Russo ve ark., 2013). Kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları yer almaktadır. Bu ilerlemelere rağmen kansere bağlı ölüm oranı hala yüksek seviyededir (Huang ve ark., 2017). Kimyasal ajanlar hücrelere farklı düzeylerde zarar vererek sitotoksositeye neden olurlar. Ajanların biyolojik aktivitesinin belirlenmesi için öncelikle toksik olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla da in vitro hücre kültüründe sitotoksosite testlerini sıklıkla kullanılmaktadır. Bu testler birçok ajan aktivitesinin kısa sürede incelenmesine olanak sağlamaktadır. MTT test yöntemi, biyoyumluluk testleri içerisinde en hızlı sonuç veren testlerden biridir (Wataha ve ark., 1992).

Likenler, biyolojik nanopartikül sentezi için öne çıkan canlı gruplardan biridir. Yosun ve mantarın simbiyotik bir birleşiminden meydana gelen likenler, çeşitli biyolojik bileşenleri içermeleri ve özellikle zengin sekonder metabolit profillerine sahip olmalarıyla bilinirler. Bu özellikleri, özellikle metal tuzları ile reaksiyona girerek farklı boyutlarda ve şekillerde nanopartiküllerin sentezlenmesini mümkün kılar (Brodo ve ark., 2001).

Biz de bu çalışmamızda; biyosentez yöntemini kullanarak elde etmiş olduğumuz düşük maliyetli, verimli ve çevreye zararsız NP'lerin kolon kanserine karşı göstermiş olduğu antikanser özelliklerini inceledik.

Arabinoksilans (AX) ve Arabinoksilanlar bazlı partiküller (AXM)'in insan kolon hücreleri (CCD 841 CoN) ile biyoyumluluğunu değerlendirmek amacıyla farklı AX ve AXM konsantrasyonları (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml) ile hazırlanan bir çalışmada AX'in insan kolon hücre hattının (CCD 841 CoN) MTT analizleri sonucunda hem AX'in hem de AXM'nin insan kolon hücre dizisi CCD 841 CoN'nin çoğalmasını engellemediğini göstermiştir (Mendez-Encinas ve ark., 2019). Yaptığımız bu çalışmada da; MTT testinden elde edilen absorbans sonuçlarına göre nanoyapıların 250 µg/ml konsantrasyonda, kontrol grubuna kıyasla önemli bir canlılık azalışına neden olduğu gözlemlenmiştir.

Zamani ve ark., (2018) ZnNP'nin meme kanseri *ZR-75-1* hücre hattı üzerindeki etkisini incelemişlerdir ve ZnNP uygulamasında hücre canlılığı oranının doza bağlı bir şekilde azaldığı belirtilmiştir. 12,5 µM ZnNP konsantrasyonunun melanom kanser hücreleri için sitotoksik olduğunu ancak bu ZnNP konsantrasyonunun *HaCaT* hücre hattı için sitotoksik

olmadığı görülmüştür. MeWo hücre hattı için 12,5 μ M FD dozunun, hücrelerdeki canlılık oranını % 50'ye kadar düşürdüğünü belirtmişlerdir (Zamani ve ark., 2018). Bu çalışmaya benzer olarak bizim yaptığımız çalışmada da hücre canlılığının doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir.

Acar ve Pehlivanoglu, (2019) kuşburnu özütüyle üretilen gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) HT29 olarak bilinen insan kolon adenokarsinoma hücre hattında antikanser potansiyelini incelemiştir. Elde edilen bulgular, doza bağımlı olarak hücre hareketliliğinin büyük oranda engellendiğini göstermiştir. Çalışmamızda bakır çiçek şekilli hibrit nanoyapıların *Cladonia subulata* ve *Cladonia rangiformis* den elde edilen bulgulara göre doza bağlı olarak hücre hareketliliğinin engellendiği gösterilmektedir.

Alqahtani ve arkadaşları (2020) *Xanthoria parietina* liken özütünden biyo-esaslı şekilde elde ettikleri AgNP'lerin, insan kolon adenokarsinoma hücre hattı (HT29) üzerindeki antikanser etkisini gözlemlemiş ve bu nanopartiküllerin hücre çoğalmasını baskıladığını belirtmişlerdir (Alqahtani ve ark., 2020). Yaptığımız çalışmada da benzer şekilde BCL2 ve Sitokrom P450 hücre hattı üzerinde antikanser etkisi gözlemlenmiştir.

Al-Zharani ve diğerleri (2021) CuNP'lerin (bakır nanopartiküllerin) MCF-7 adlı insan meme kanseri ve LoVo kolon kanseri hücrelerinde sitotoksikiteyi tetiklediğini kaydetmiştir. Aynı araştırma, bu nanopartiküllerin Bax, P53 ile Caspase 9, 8 ve 3 genlerinde belirgin düzeyde yükselmeye neden olduğunu da göstermiştir (Al-Zharani ve ark., 2021).

Behzadi ve ekibi (2019) MgO nanopartiküllerinin K562 (insan kronik miyelojenöz lösemi) hücre hattı üzerindeki antikanser etkinliğini analiz etmiştir. Çalışmada 0,1-30 μ g/mL aralığında uygulanan MgO nanopartiküllerinin doza bağımlı şekilde hücre canlılığını düşürdüğü, özellikle 1 μ g/mL'de K562 hücrelerinin hayatta kalma oranını %78,5'e kadar gerilettiği kaydedilmiştir (Behzadi ve ark., 2019).

Bir başka araştırma Dolati ve ark., (2023) tarafından gerçekleştirilmiştir. *Bacillus coagulans* yardımıyla sentezlenen CuO nanopartiküllerinin, meme kanseri hücrelerinde yüksek düzeyde sitotoksik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Biyolojik kaynaklı CuONP'ler, MCF-7 ve SKBR3 hattında doz ve zamanla bağlantılı olarak çoğalmayı kayda değer şekilde inhibe etmiş; özellikle MCF-7 hattında SKBR3'e kıyasla daha yüksek antiproliferatif aktivite

bildirilmiştir (Dolati ve ark., 2023). Dadhwal ve ark., (2023) *Hippophae rhamnoides* (L.) (yabani iğde) kullanarak sentezledikleri CuNP'lerin kanser hücre canlılığını 100 µg/mL dozunda % 28,18'e kadar düşürebildiğini tespit etmiştir (Dadhwal ve ark., 2023). Ghasemi ve ark., (2022)'nin yaptıkları araştırmada ise, CuNP'lerin (bakır nanopartiküllerinin) insan kolorektal kanser hücre hattı (*SW480*) üzerinde oksidatif stres yaratma ve apoptozu tetikleme kabiliyetini incelemişlerdir. MTT analizinden elde edilen sonuçlar, CuNP'lerin *SW480* hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Ghasemi ve ark., 2022).

Miri ve Sarani (2018) *Prosopis farcta* bitkisinden sentezledikleri AgNP'lerin akciğer (*A549*) ve kolon (*HT29*) kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini değerlendirmiştir. MTT verilerine göre, *A549* hattında 250 µg/ml üzerinde % 50 hücre hasarı görülürken, *HT29* hattında 500 µg/ml üstündeki konsantrasyonlarda tamamen apoptoza gidildiği raporlanmıştır (Miri ve Sarani, 2018).

Palanisamy ve Pazhanivel (2017) tembul bitkisinin yapraklarından hazırladıkları ekstraktla elde ettikleri MgO nanopartikülünün antibakteriyel gücünü kimyasal sentezle üretilmiş MgO nanopartikülleriyle kıyaslamıştır. *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* üzerinde yapılan testlerde, 80 µg/µl düzeyindeki doğal sentezli nanopartiküller kimyasal sentezliye göre daha yüksek inhibisyon zonu oluşturmuştur (Palanisamy ve Pazhanivel, 2017).

Rehana ve ark., (2017) *MCF-7*, *HeLa* ve *A549* gibi çeşitli kanser hücre hatlarında, farklı bitkilerin (*Hibiscus rosasinensis*, *Murraya koenigii*, *Moringa oleifera* ve *Tamarindus indica*) yaprak ekstraktlarıyla sentezlenen CuO nanopartiküllerin, kimyasal yolla üretilen CuONP'lerden daha yüksek bir sitotoksikite düzeyine sahip olduğunu ifade etmişlerdir (Rehana ve ark., 2017).

Yapılan diğer çalışmalarda; Safaei ve arkadaşları (2019) *Acetobacter xylinum* bakterisinden elde edilen bakteriyel selülozu, magnezyum oksit nanopartiküllerle birleştirerek “bakteriyel selüloz-magnezyum oksit biyokompozit” meydana getirmiştir. *MCF-7* (meme kanseri) hücre hattı üzerindeki antikanser aktivitesini, Taguchi yöntemiyle dokuz farklı kombinasyon test ederek incelemişlerdir. Magnezyum oksit nanopartikülleri ikinci seviyede % 65,88 oranında hücre inhibisyonu göstermiş, en düşük etki ise birinci seviyede % 44,66 olarak belirtilmiştir (Safaei ve ark., 2019). Yaqub ve ark., (2020) *Zingiber officinale* (zencefil) ile *Allium sativum* (sarımsak) ekstraktlarını kullanarak ürettikleri CuNP'lerin *HeLa* ve *HepG2*

hücre hatlarında antikanser davranış sergilediğini göstermiştir (Yağub ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da *Cladonia rangiformis* ve *Cladonia subulata* da benzer şekilde *BCL2* ve *Sitokrom P450* hücre hatlarında antikanser davranış gösterdiği görülmektedir.

Sonuç olarak; yukarıda belirtilen literatür bilgileri ve tez çalışmasından elde edilen veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde; *Cladonia subulata* ve *Cladonia rangiformis* likenlerinden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartiküllerin kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve gen ifadesi üzerindeki etkileri bu çalışmada ayrıntılı olarak incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları, nanoteknolojinin kanser tedavisindeki potansiyelini ve doğal kaynaklardan elde edilen nanopartiküllerin çevresel olarak daha sürdürülebilir bir seçenek olabileceğini vurgulamaktadır. *C. subulata* ve *C. rangiformis* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartiküllerin biyolojik sentez yöntemi, bu nanopartiküllerin biyolojik olarak daha uyumlu ve çevresel olarak daha dostça olmasını sağlamaktadır. Tüm bu bulgular, sentezi yapılan Cu-çiçek şekilli nanopartiküllerin, hem kolon kanseri hücrelerinde hem de sağlıklı kolon hücrelerinde potansiyel antikanser etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Elde edilen veriler bu nanopartiküllerin kanser tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilmesini desteklemektedir.

Ancak, bu çalışmanın sınırlamaları da göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışma sadece in vitro koşullarda gerçekleştirilmiş olup, bu nedenle elde edilen bulguların klinik uygulanabilirliği hakkında kesin sonuçlar çıkarmak için daha araştırmaya ihtiyaç olduğu unutulmamalıdır. Ayrıca, nanopartiküllerin hücresel ve moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için daha fazla çalışma ve klinik araştırmaların yapılması, bu nanopartiküllerin etkinliğinin ve güvenilirliğinin kesinleştirilmesi için gereklidir.

KAYNAKLAR

- Acar, Ç. A. and Pehlivanoglu, S. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Rosa canina* extract and its anti-cancer and anti-metastatic activity on human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute*, 7(2), 124-131.
- Adams, J. M. and Cory, S. (2007). The *BCL-2* apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337.
- Ahti, T., Stenroos, S. and Moberg, R. (2013). *Nordic Lichen Flora*, Volume 5: Cladoniaceae. Nordic Lichen Society.
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R. and Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415-421.
- Alqahtani, M. A., Al Othman, M. R. and Mohammed, A. E. (2020). Bio fabrication of silver nanoparticles with antibacterial and cytotoxic abilities using lichens. *Scientific Reports*, 10(1), 16781.
- Al-Zharani, M., Qurtam, A. A., Daoush, W. M., Eisa, M. H., Aljarba, N. H., Alkahtani, S. and Nasr, F. A. (2021). Antitumor effect of copper nanoparticles on human breast and colon malignancies. *Environmental Science Pollution Research International*, 28(2), 1587-1595.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. and Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097-2116.
- Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Gronwald, J. and Easton, D. F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117-1130.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691.
- Asplund, J. and Gauslaa, Y. (2007). Content of carbon-based secondary compounds in boreal macrolichens: seasonal, metabolic and anatomical sources of variation. *New Phytologist*, 175(3), 462-469.
- Ata, M. S., Yılmaz, E. A., Polatçı, Ş. and Bölükbaşı, E. (2024). An In Vitro Study: Assessment of Gene Expression Changes Induced by Nanoparticles Synthesized from *Cladonia subulata* Lichen on Colon Cell Lines. *International Journal of Nature and Life Sciences*, 8(1), 23-35.

- Baran, M. F. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using *Pistacia terebinthus* leaf extract: antimicrobial effect and characterization. *Internal J. Math, Eng And Nature Science.*, 2602(5).
- Bass, R., Maurer, H. H., Peters, F. T. and Wissenbach, D. K. (2009). Screening for about 500 drugs and their metabolites in serum and plasma using GC-MS with library searching. *Pharmacopsychiatry*, 42(Suppl 1), 68-69.
- Baylin, S. B. and Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome- Biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, 11(10), 726-734.
- Behzadi, E., Sarsharzadeh, R., Nouri, M., Attar, F., Akhtari, K., Shahpasand, K. and Falahati, M. (2019) Albumin binding and anticancer effect of magnesium oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14: 257-270
- Berridge, M. V., Herst, P. M. and Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- Bhattacharya, R. and Guha, A. K. (2016). Biosynthesis of metal nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), 34-59.
- Bhushan, B. (2017). *Springer Handbook of Nanotechnology*.
- Bopp, S. K. and Lettieri, T. (2008). Gene regulation in HepG2 cells exposed to organophosphorus pesticides: Microarray analysis. *Toxicology Letters*, 176(1), 79-89.
- Boustie, J. and Grube, M. (2005). Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273-287.
- Bölükbaşı, E. (2022). Influence of boron treatments on fatty acid desaturase metabolism in different safflower cultivars. *Plant, Soil & Environment*, 68(10).
- Bölükbaşı, E., Avuloglu-Yilmaz, E. and Yildirim, T. (2023). Effects of some flavor enhancer food additives on expression of cancer-related genes in MCF-7 and MCF-12A cells. *Cogent Food & Agriculture*, 9(2), 2272469.
- Branquinho, C., Pinho, P. and Cruz, C. (2015). Functional groups of terricolous lichens respond differently to land-use changes in Mediterranean ecosystems. *Applied Vegetation Science*, 18(1), 113-122.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Brodeur, G. M. (2003). Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*, 3(3), 203-216.

- Brodo, I. M., Sharnoff, S. D. and Sharnoff, S. (2001). *Lichens of North America*. New Haven, CT: Yale University Press.
- Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257.
- Carter, B. Z., Mak, P. Y., Mu, H., Zhou, H., Mak, D. H., Schober, W. D. and Andreeff, M. (2020). Synergistic targeting of *MCL1* and *BCL2* in AML. *Blood*, 136(8), 845-853.
- Chabner, B. A. and Roberts Jr, T. G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 65-72.
- Chan, A. T., Giovannucci, E. L. and Meyerhardt, J. A. (2011). Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to lifestyle factors. *Cancer Prevention Research*, 4(5), 654-663.
- Chan, D. W. (2010). The changing face of tumor markers: Responding to biochemical and molecular advances. *Clinica Chimica Acta*, 411(23-24), 1905-1909.
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J. and McArthur, G.A. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*, 364(26), 2507-2516.
- Chen, M., Yin, J., Liang, Y. and Yuan, S. (2016). Biosynthesis of nanomaterials by microorganisms and their applications. *Current Nanoscience*, 12(1), 38-55.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. and Green, D. R. (2010). The *BCL-2* family reunion. *Molecular cell*, 37(3), 299-310.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M. and Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13944-13949.
- Cory, S. and Adams, J. M. (2002). The *BCL2* family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.
- Cox, A. D., Der, C. J. and Philips, M. R. (2015). Targeting RAS membrane association: Back to the future for anti-RAS drug discovery? *Clinical Cancer Research*, 21(8), 1819-1827.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502-511.
- Culberson, C. F. (1972). Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography A*, 72(1), 113-125.
- Çakar, T. (2009). Likenlerin Karatepe Aslantaş Açık Hava Müzesi Bazaltik Kayaç Eserler Üzerindeki Ayrışmaya. *Bozunmaya Etkisi, Çukurova Üniversitesi, FBE Arkeometri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*, Adana, Türkiye, 69s.

- Dadhwal, P., Dhingra, H. K., Dwivedi, V., Alarifi, S., Kalasariya, H., Yadav, V. K. and Patel, A. (2023). *Hippophae rhamnoides* L. (sea buckthorn) mediated green synthesis of copper nanoparticles and their application in anticancer activity. *Frontiers in molecular biosciences*, 24(10), 1246728.
- Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*, 149(1), 22-35.
- Decker, T. and Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumour necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1), 61-69.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. and Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet (London, England)*, 394(10207), 1467-1480.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.
- Denkbaş, E. B. (2015). Nanotechnology in Turkey. *The Informatics Association of Turkey Informatics Magazine*, 172, 78–87.
- Diamandis, E. P. (2010). Cancer biomarkers: Can we turn recent failures into success?. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(19), 1462-1467.
- Dick, F. A. and Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 297-306.
- Dolati, M., Tafvizi, F., Salehipour, M., Komeili-Movahed, T. and Jafari, P. (2023). Biogenic copper oxide nanoparticles from *Bacillus coagulans* induced reactive oxygen species generation and apoptotic and anti-metastatic activities in breast cancer cells. *Scientific Reports*, 13(1), 3256.
- Elliott, N. T. and Yuan, F. A. N. (2011). A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(1), 59-74.
- Ellis, C. J. and Coppins, B. J. (2006). Contrasting functional traits of litter-dwelling lichens and mosses explain Lobarion communities under thinning regimes in *Pinus sylvestris* plantations. *Biological Conservation*, 127(1), 95-105.
- Esmeeta, A., Adhikary, S., Dharshnaa, V., Swarnamughi, P., Ummul Maqsummiya, Z., Banerjee, A., Pathak, S. and Duttaroy, A. K. (2022). Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomed Pharmacother*, 153, 113384
- Evan, G. I. and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342-348.

- Fawzy, M., Khairy, G. M., Hesham, A., Rabaan, A. A., El-Shamy, A. G. and Nagy, A. (2021). Nanoparticles as a novel and promising antiviral platform in veterinary medicine. *Arch Virol*, 166(10), 2673-2682.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M. and Bray, F. (2019). Global Cancer Observatory: Cancer Today. *International Agency for Research on Cancer*.
- Fernandes, C. M. and Hamdy, R. C. (2017). Molecular biology of cancer. *Orthopedic Clinics*, 48(3), 217-234.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453-458.
- Fotakis, G. and Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Garraway, L. A. and Lander, E. S. (2013). Lessons from the cancer genome. *Cell*, 153(1), 17-37.
- Ghasemi, P., Shafiee, G., Ziamajidi, N. A. and Abbasalipourkabir, R. (2023). Copper Nanoparticles Induce Apoptosis and Oxidative Stress in SW480 Human Colon Cancer Cell Line. *Biological Trace Element Research*, 201(8), 3746-3754.
- Ghosh, R. and Laskar, S. (2020). Molecular biomarkers in cancer. *BioMed Research International*, 2020, 1-23.
- Greaves, M. and Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313.
- Guengerich, F. P. (2015). Introduction to cytochrome *P450* enzymes. In: Ortiz de Montellano, P.R. (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (4th ed., pp. 1-42).
- Hanahan, D. and Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hannafon, B. N. and Ding, W. Q. (2013). Intercellular communication by exosomes in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14240-14269.
- Helin, K. and Dhanak, D. (2013). Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature*, 502(7472), 480-488.
- Henry, N. L. and Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*, 6(2), 140-146.

- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374.
- Hofland, L. J. and Pollak, M. N. (2010). Insulin-like growth factor pathways in prostate cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(9), 610-618.
- Huang, S., Miao, Y., Yuan, F., Gnyp, M. L., Yao, Y., Cao, Q. and Bareth, G. (2017). Potential of RapidEye and WorldView-2 satellite data for improving rice nitrogen status monitoring at different growth stages. *Remote Sensing*. 9(3): 227
- Ilango, S. P., Ilango, S., Aravindhan, V., Subbarao, B. T., Anand, V. R. and Deepa, S. (2010). Tumour markers in clinical practice: A review. *British Journal of Medical Practitioners*, 3(2), a327.
- Joyce, J. A. and Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 239-252.
- Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Tu, D., Tebbutt, N. C. and Zalcberg, J. R. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(17), 1757-1765.
- Knudson Jr, A. G. (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820-823.
- Koca, F. D., Demirezen Yilmaz, D., Ertaş Onmaz, N., Yılmaz, E. and Öçsoy, İ. (2020). Green synthesis of allicin based hybrid nanoflowers with evaluation of their catalytic and antimicrobial activities. *Biotechnology Letters*, 42(9), 1683-1690.
- Konopleva, M. and Letai, A. (2018). *BCL-2* inhibition in AML: Mechanisms, synergies, and clinical impact. *Nature Reviews Cancer*, 18(5), 299-312.
- Lamba, J. K. and Schuetz, E. G. (2006). Genetic polymorphisms of drug metabolism enzymes in oncology: Clinical relevance and implications. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 789-802.
- Lane, D. P. (2010). p53, guardian of the genome. *Nature*, 408(6810), 25-26.
- Lawrey, J. D. (2011). Biological role of lichen substances. In T. H. Nash III (Ed.), *Lichen Biology* (2nd ed., pp. 104-124). Cambridge: Cambridge University Press.
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Lubner, B. S. and Azad, N. S. (2015). PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 372(26), 2509-2520.
- Liao, C., Li, Y. and Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 449.
- Liaw, D., Marsh, D. J., Li, J., Dahia, P. L., Wang, S. I., Zheng, Z. and Parsons, R. (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genetics*, 16(1), 64-67.

- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M. and Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer- Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine*, 343(2), 78-85.
- Liotta, L. A. and Petricoin, E. F. (2010). Molecular profiling of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 59-70.
- Livak K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). 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.
- Lord, C. J. and Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), 110-120.
- Lynch, H. T. and De la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(10), 919-932.
- Marusyk, A., Almendro, V. and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer?. *Nature Reviews Cancer*, 12(5), 323-334.
- Massagué, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432(7015), 298-306.
- Mendez-Encinas, M.A., Carvajal-Millan, E., Rascón-Chu, A., Astiazarán-García, H., Valencia-Rivera, D. E., Brown-Bojorquez, F. and Velazquez, C. (2019). Arabinoxylan-based particles: in vitro antioxidant capacity and cytotoxicity on a human colon cell line. *Medicina* 2019, 55, 349.
- Miri, A. and Sarani, M. (2018). Silve Nanoparticles: Cytotoxic and Apoptotic Activity on HT-29 and A549 Cell Lines. *Journal of New Developments in Chemistry*, 1(4), 1-6.
- Mittal, A. K., Chisti, Y. and Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2): 346-356.
- Miyazawa, T., Itaya, M., Burdeos, G. C., Nakagawa, K. and Miyazawa, T. (2021). A Critical Review of the Use of Surfactant-Coated Nanoparticles in Nanomedicine and Food Nanotechnology. *International Journal of Nanomedicine*, 9(16), 3937-3999.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nash, T. H., Ryan, B. D., Gries, C. and Bungartz, F. (eds.) (2002). Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region. V:1.
- Navin, N. (2014). Cancer genomics: one cell at a time. *Genome Biology*, 15(8), 452.
- Nebert, D. W. and Dalton, T. P. (2006). The role of cytochrome *P450* enzymes in endogenous signaling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), 947-960.

- Nelson, D. R. (2009). The cytochrome *P450* homepage. *Human Genomics*, 4(1), 59-65.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y. J., Jackson, R. A. and Thiery, J. P. (2016). Emt: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45.
- Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: Origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a001008.
- Palanisamy, G. and Pazhanivel, T. (2017) Green synthesis of MgO nanoparticles for antibacterial activity. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)* 4(9): 137-141.
- Pepe, M. S., Etzioni, R., Feng, Z., Potter, J. D., Thompson, M. L., Thornquist, M. and Yasui, Y. (2001). Phases of biomarker development for early detection of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(14), 1054-1061.
- Pinho, P., Dias, T., Cruz, C. and Branquinho, C. (2011). Using lichen functional groups as ecological indicators of the effects of land-use in Mediterranean ecosystems. *Ecological Indicators*, 11(2), 361-367.
- Prior, I. A., Lewis, P. D. and Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research*, 72(10), 2457-2467.
- Purvis, O. W. (2000). Lichens. London: The Natural History Museum.
- Purvis, O. W., Coppins, B. J., Hawksworth, D. L., James, P. W. and Moore, D. M. (Eds.). (1992). The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. London: Natural History Museum Publications.
- Reed, J. C. (1998). *BCL-2* family proteins. *Oncogene*, 17(25), 3225-3236.
- Rehana, D., Mahendiran, D., Kumar, R. S. and Rahiman, A. K. (2017). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of copper oxide nanoparticles synthesized using medicinally important plant extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 1067-1077.
- Rendic, S. and Guengerich, F. P. (2012). Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism studied by radiometric analysis and by LC-MS/MS: A review. *Chemical Research in Toxicology*, 25(7), 1316-1383.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J. and Minor, L. (2013). Cell viability assays. In Sittampalam, G. S. and (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly and Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M. and Coleman, W. B. (2013). Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. *The American Journal of Pathology*, 183(4), 1113-1124.

- Rosi, N. L. and Mirkin, C. A. (2005). Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*, 105(4), 1547-1562.
- Russo, A., Formisano, C. and Rigano, D. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 42-47
- Safaei, M., Taran, M., Rezaei, R., Mansouri, K., Mozaffari, H. R., Imani, M. M. and Sharifi, R. (2019) Synthesis and anticancer properties of bacterial cellulose-magnesium oxide bionanocomposite. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* 32(1): 29-33
- Schreiber, R. D., Old, L. J. and Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024), 1565-1570.
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. and Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426-437.
- Shalem, O., Sanjana, N. E. and Zhang, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Reviews Genetics*, 16(5), 299-311.
- Sharma, S., Kelly, T. K. and Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177-182.
- Smith, C. W., Aptroot, A., Coppins, B. J., Fletcher, A., Gilbert, O. L., James, P. W. and Wolseley, P. A. (Eds.). (2009). The Lichens of Great Britain and Ireland. London: British Lichen Society.
- Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S. and Mano, H. (2007). Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), 561-566.
- Song, M. S., Salmena, L. and Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), 283-296.
- Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J. and Tse, C. (2013). ABT-199, a potent and selective *BCL-2* inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), 202-208.
- Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, 12(8), 895-904.
- Stenroos, S., Hyvönen, J., Myllys, L., Thell, A. and Ahti, T. (2002). Phylogeny of the Genus *Cladonia* s. str. (Cladoniaceae, Ascomycota) Inferred from rDNA ITS Data. *Cladistics*, 18(3), 237-278.

- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. M. and Cory, S. (2000). Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 217-245.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J. and Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724.
- Tarannum, N. and Gautam, Y. K. (2019). Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: a state-of-the-art review. *Royal Society of Chemistry Advances*, 9(60), 34926-34948.
- Topalian, S. L., Drake, C. G. and Pardoll, D. M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 24(2), 207-212.
- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C. and Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226(4678), 1097-1099.
- US Preventive Services Task Force, Davidson, K. W., Barry, M. J., Mangione, C. M., Cabana, M., Caughey, A. B., Davis, E. M. and Wong, J. B. (2021). Screening for colorectal cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA*, 325(19), 1965-1977.
- Van Tonder, A., Joubert, A. M. and Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, 8, 47.
- VanArsdale, T., Boshoff, C., Arndt, K. T. and Gill, S. (2015). Molecular pathways: Targeting the cyclin D–CDK4/6 axis for cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 21(13), 2905-2910.
- Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988). *BCL-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), 440-442.
- Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Cell*, 108(2), 171-182.
- Vermes, I., Haanen, C. and Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), 167-190.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789-799.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A. J. and Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127), 1546-1558.
- Vogler, M., Dinsdale, D., Dyer, M. J. S. and Cohen, G. M. (2009). *BCL-2* inhibitors: Small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 16(3), 360-367.

- Vousden, K. H. and Prives, C. (2009). Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431.
- Wan, J. C., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C. and De Bono, J. S. (2017). Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*, 17(4), 223-238.
- Wataha, J. C., Craig, R. G. and Hanks, C. T. (1992). Precision of and New Methods for Testing In Vitro Alloy Cytotoxicity. *Dent Mater*; 8:65-70
- WCRF/AICR. (2018). Continuous update project report: Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research.
- Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer*. New York: Garland Science.
- Wirth, V. (1995). *Die Flechten Baden-Württembergs*. Stuttgart: Ulmer.
- Wrighton, S. A., Stevens, J. C., Becker, G. W. and Doll, M. A. (1987). Purification and characterization of multiple forms of cytochrome P-450 from human liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258(2), 584-595.
- Wulfkühle, J. D., Liotta, L. A. and Petricoin, E. F. (2003). Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 267-275.
- Yaqub, A., Malkani, N., Shabbir, A., Ditta, S. A., Tanvir, F., Ali, S. and Ullah, R. (2020). Novel Biosynthesis of Copper Nanoparticles Using *Zingiber officinale* and *Allium sp.* with Synergic Effect of Doxycycline for Anticancer and Bactericidal Activity. *Current Microbiology*, 77(9), 2287-2299.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 127-137.
- Youle, R. J. and Strasser, A. (2008). The *BCL-2* protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47-59.
- Zamani, A. R. N., Mashayekhi, M. R., Jadid, M., Faridvand, Y., Tajalli, H. and Rahbarghazi, R. (2018). Photo-modulation of zinc phthalocyanine-treated breast cancer cell line ZR-75-1 inhibited the normal tumor activity in vitro. *Lasers in Medical Science*, 33, 1969-78.
- Zanger, U. M. and Schwab, M. (2013). Cytochrome *P450* enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103-141.
- Zhang, W. and Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9-18.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Şeyda AKÇA

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1. Polatcı, Ş., Bölükbaşı, E. and Karakaş, M. (2023). Analysis Of Genetic And Epigenetic Changes Caused By Lead Toxicity In Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant. 4th International Mediterranean Scientific Research And Innovation Congress, 9-10 December 2023, Online, Adana, Türkiye.
2. Polatcı, Ş. and Bölükbaşı, E. (2023). In Vitro Cytotoxic Effects Of Nanoparticles Obtained From *Cladonia subulata* Lichen By Biological Synthesis On Colon Cell Lines. 5th International Harran Congress on Scientific Research, 8-10 December 2023, Online, Şanlıurfa, Türkiye.
3. Polatcı, Ş. and Bölükbaşı, E. (2023). Determinationn Of The In Vitro Cytotoxic Activity Of Flower-Shaped Copper Nanoparticles Obtained With *Cladonia rangiformis* Lichen Extract In DLD-1 Cell Lines. 12th International Euroasia Congress on Scientific Researches and Recent Trends, 29-30 November 2023, Online, Ankara, Türkiye.
4. Polatcı, Ş. and Bölükbaşı, E. (2024). Detection Of Antimicrobial Effects Of Flowe-Shaped Hybrid Nanostructures Obtained By Biological Synthesis From Different *Cladonia* (L.) Lihen Species. 10th International Artemis Scientific Research Congress, 29-30 November 2024, Online, Bükreş, Romanya.
5. Ata, M. S., Yılmaz, E. A., Polatcı, Ş. and Bölükbaşı, E. (2024). An In Vitro Study: Assessment of Gene Expression Changes Induced by Nanoparticles Synthesized from *Cladonia subulata* Lichen on Colon Cell Lines. *International Journal of Nature and Life Sciences*, 8(1), 23-35.