T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE BAZI KARAYOSUNU ETANOL EKSTRAKTLARININ HCT116 KOLOREKTAL KANSER HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN VE MOLEKÜLER DÜZEY DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ

HİLAL ZENGİN KÖKSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ DİLŞAD ÖZERKAN

MAYIS - 2021
KASTAMONU

TEZ ONAYI

HİLAL ZENGİN KÖKSAL tarafından hazırlanan "**SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE BAZI KARAYOSUNU ETANOL EKSTRAKTLARININ HCT116 KOLOREKTAL KANSER HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN VE MOLEKÜLER DÜZEY DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **04.05.2021** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Dilşad ÖZERKAN İstinye Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr.Öğr.Üyesi Cevriye KALKANDELEN İstanbul Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü Prof. Dr. İzzet ŞENER .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Hilal ZENGİN KÖKSAL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE BAZI KARAYOSUNU ETANOL EKSTRAKTLARININ HCT116 KOLOREKTAL KANSER HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN VE MOLEKÜLER DÜZEY DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ

HİLAL ZENGİN KÖKSAL

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN:DR. ÖĞR. ÜYESİ DİLŞAD ÖZERKAN

Kanser, vücudun herhangi bölgesinde yer alan hücre grubunun kontrolsüz olarak çevresindeki normal dokulardan daha hızlı çoğalması, farklılaşmasının bozulması, çevre dokulara infiltrasyonu ve bu hücrelerin dolaşıma geçerek vücudun farklı bölgelerine metastazı ile karakterize edilen bir hastalıktır. Kolon kanseri neredeyse her yıl bir milyondan fazla yeni tanıların koyulduğu ve dünyada en sık rastlanan üçüncü kanser türüdür. Her yaş grubunda görülebildiği gibi kalıtımsal kökenli değildir. Bu veriler göz önüne alındığında kanserin tedavisi için yeni ilaç kombinasyonlarının araştırılması önemli bir ihtiyaçtır. Bu çalışmada, anti-kanser aktivitesi bilinmeyen *Syntrichia ruraliformis* (K1), *Hypnum andoi* (K2), *Plathypnidium riparioides* (K3) karayosunu türlerinden elde edilen ekstrelerin HCT116 kolon kanser hücre hatlarına karşı etkileri değerlendirilmiştir. Karayosunu türlerinin etil alkol çözücüsünde elde edilen ekstrelerinden, DMSO ile stok solüsyonlar hazırlanarak çeşitli konsantrasyonlarda sitotoksite test (MTT) deneyleri yapılmıştır. HCT116 serisinde bulunan tüm karayosunu türlerinin IC_{50} değerlerine göre belirlenen dozlar aynı şekilde mezenkimal kök hücrelere (MKH) uygulanmıştır. Ayrıca, Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi üç karayosununa maruz kalan kanser hücrelerini analiz etmek için kullanılmıştır. Sonuç olarak, karayosunu türlerinin HCT116 kolorektal kanser hücre hattına karşı yüksek oranda sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği, bunun aksine MKH hücrelerinde letal olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, FTIR spektrumu ile elde edilen sonuçların tüm sitotoksik verilerle paralel seyrettiği moleküler düzeyde de belirlenmiştir. Tüm sonuçların ışığında bu karayosunu türlerinin, biyoaktif bileşenleri belirlendiği takdirde, potansiyel kanser ilacı olma özelliğine sahip olduğu düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Briyofita, sitotoksik, kolorektal kanser, HCT116, FTIR

Mayıs 2021, 71 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SOME BRYOPHYTE ETHANOL EXTRACTS ON HCT116 COLORECTAL CANCER CELL VIABILITY AND MOLECULAR LEVEL CHANGES BY SPECTROSCOPIC METHODS

HİLAL ZENGİN KÖKSAL

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERIN

SUPERVISOR:ASSIST. PROF. DR. DİLŞAD ÖZERKAN

Cancer is a disease characterized by the uncontrolled growth of a group of cells in any part of the body faster than the surrounding normal tissues, impaired differentiation, infiltration into surrounding tissues, and metastasis of these cells to different parts of the body by passing into the circulation. Colon cancer is the third most common type of cancer in the world, with more than a million new diagnoses every year. As can be seen in all age groups, it is not inherited. Considering these data, it is an important need to research new drug combinations for the treatment of cancer. In this study, the effects of extracts obtained from *Syntrichia ruraliformis* (K1), *Hypnum andoi* (K2), *Plathypnidium riparioides* (K3) bryophyte species against HCT116 colon cancer cell lines were evaluated. Cytotoxicity test (MTT) measurements were performed at various concentrations by preparing stock solutions with DMSO from extracts of bryophyte species obtained in ethyl alcohol solvent. The doses determined according to the IC_{50} values of all moss species in the HCT116 series were applied to the mesenchymal stem cells (MSCs) in the same way. In addition, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to analyze cancer cells exposed to three mosses. As a result, it was determined that moss species had a highly cytotoxic and antiproliferative effect against HCT116 colorectal cancer cell line, on the contrary, it was not lethal in MSC cells. In addition, it was determined at the molecular level that the results obtained with the FTIR spectrum were parallel to all cytotoxic data. In the light of all the results, these bryophyte species are considered to be potential cancer drugs if their bioactive components are determined.

KEYWORDS: Bryophyte, cytotoxicity, colorectal cancer, HCT116, FTIR

May 2021, 71 Page

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım esnasında yan yana olamasak da her an bir telefon kadar uzağımda olan, ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyerek büyük desteğini gördüğüm, güler yüzünü benden eksik etmeyen danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Dilşad ÖZERKAN'a, çalışmalarım sırasında laboratuvarını kullanmama izin vererek, öneri ve yardımlarını esirgemeyen yüksek lisansımı tamamlamada büyük emeği geçen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Üyesi Nuray EMİN'e, karayosunlarının teminini sağlayarak çalışmalarımıza katkıda bulunan Sayın Sayın Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER ve Doç. Dr. Kerem CANLI'ya, bilgi ve becerilerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Ülke ÇALIŞKAN'a, her daim yanımda olan, beraber üzülüp beraber güldüğüm sevgili arkadaşım İpek CEYLAN'a, bu koşuşturmalı tempoda benimle beraber olarak yükümü hafifletmeye çalışan sevgili arkadaşım Havva YAZAR'a, destekleriyle beni her zaman ayakta tutan ve dualarıyla beni yalnız bırakmayan sevgili anneme babama ve kız kardeşime, hayatıma yüksek lisansımın son yılı girerek güler yüzünü ve ilgisini eksik etmeyen canım eşim Halil İbrahim KÖKSAL'a ve bu yolda bana destek veren herkese teşekkür ederim.

HİLAL ZENGİN KÖKSAL

Kastamonu, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Kanser 1
1.1.1 Kolon Kanseri 3
1.1.2 Kolon Kanserinde Epigenetik Değişiklikler 3
1.1.3 Kolon Kanserinin Epidemiyolojisi 5
1.1.4 Kolon Kanserinin Risk Faktörleri 5
1.1.5 Kolon Kanserinin Etiyolojisi 6
1.1.5.1 Yaş 6
1.1.5.2 Adenomatoz polip geçmişi 6
1.1.5.3 İnflamatuar bağırsak hastalığı geçmişi 7
1.1.5.4 Kolorektal kanser veya adenomatoz polip geçmişi 7
1.1.5.5 Kalıtsal genetik risk 7
1.1.5.6 Çevresel risk faktörleri 8
1.1.5.7 Beslenme uygulamaları 8
1.1.5.8 Fiziksel aktivite ve obezite 9
1.1.5.9 Sigara kullanımı 9
1.1.5.10 Ağır alkol tüketimi 10
1.1.6 Kolon Kanseri Histolojik Alt Tipleri 10
1.1.7 Kolon Kanserinin Tanısı ve Kullanılan Yöntemler 10
1.1.8 Kolon Kanserinde Evrelendirme 11
1.1.9 Kolon Kanserinde Tedavi 12
1.1.10 Kolon Kanseri Patolojisi 13
1.1.11 Kolon Kanserinde Tümör Yayılımı ve Metastaz 13
1.1.12 Kolon Kanserinde Adenom-Karsinom Dönüşümü 14
1.1.13 Kolon Kanseri Kök Hücreleri 14
1.2 Briyofita 14
1.2.1 Karayosunlarının Özellikleri 16
1.2.2 Karayosunlarında Üreme 18
1.2.3 Yaşam Döngüsü 19
1.2.4 Karayosunları ve Beslenme 19
1.2.5 Karayosunlarının Kullanım Alanları 20
1.2.5.1 Ekolojik kullanımlar 20
1.2.5.2 Bahçe bitkileri süslemesinde kullanım alanları 21
1.2.5.3 Yakıt olarak briyofitler 22
1.2.5.4 Ev yapımı 22

1.2.5.5 Tıbbi kullanımı 23
1.2.6 Karayosunlarının Antimikrobiyal Etkisi 24
1.2.7 Bazı Karayosunu Türleri ve Çeşitli Kanserler Üzerine Yapılan Çalışmalar 25
1.2.8 Tez Çalışmasında Kullanılan Karayosunu Türleri 26
2. YÖNTEM 30
2.1 Etil Alkol Ekstraktının Hazırlanması 31
2.2 Hazırlanan Ekstraktan Çözücünün Uzaklaştırılması 33
2.3 Çözücünün Uzaklaştığı Ekstrakların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması 35
2.4 Kolorektal Kanser Hücre Kültürünün Hazırlanması 35
2.4.1 Vasat Hazırlanması 35
2.4.2 Kolorektal Karsinoma Hücre Serisinin Hazırlanması 35
2.4.3 Karayosunu Ekstrelerinin Stok Çözeltilerinin ve Farklı Konsantrasyonlarda Doz Hazırlanması 36
2.4.4 MTT Analizi 37
2.5 Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Hazırlanması 38
2.5.1 Mezenkimal Kök Hücre Vasatının Hazırlanışı ve Hücrelerin Büyütülmesi 39
2.5.2 Karayosunu Türlerinin Mezenkimal Kök Hücrelerine Uygulanması 39
2.5.3 FT-IR Analizi İçin Numune Hazırlanması 40
2.5.4 İstatiksel Analiz 41
3. BULGULAR 42
3.1 Morfolojik Bulgular 42
3.2 Hücre Canlılığı Bulguları 42
3.3 Mezenkimal Kök Hücre Bulguları 46
3.4 FT-IR Bulguları 47
3.4.1 Lipit Bölgesi Sonuçları 48
3.4.2 Protein Bölgesi Sonuçları 49
3.4.3 Nükleik Asit Bölgesi Sonuçları 50
3.4.4 FTIR Sonuçlarının Biyolojik Açıdan Önem Analizi 51
4. SONUÇ VE ÖNERİLER 57
KAYNAKLAR 61
ÖZGEÇMİŞ 71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 *Pohlia, Blasia, Rhodobryum* karayosunlarına ait görseller 21
Şekil 1.2 *Polytricum commine* ve *Bartramia pomiformis* karayosunlarına ait görseller..... 22
Şekil 1.3 *Sphagnum* türünden bandaj dizilirken 23
Şekil 1.4 *Sphagnum* dizilirken 24
Şekil 1.5 *Hypnum andoi*..... 27
Şekil 1.6 *Syntrichia ruraliformis* 27
Şekil 1.7 *Platyhypnidium riparioides* 28
Şekil 2.1 Karayosunlarının havanda toz haline getirilmesi..... 32
Şekil 2.2 Karayosunlarının orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilmesi..... 33
Şekil 2.3 Etil alkol ekstraksiyonunun Whatman no:1 filtre kağıdında süzülmesi..... 34
Şekil 2.4 Etil alkolün evaporasyon yöntemi ile uzaklaştırılması işlemi 34
Şekil 2.5 %80 doluluğa ulaşan HCT116 hücreleri..... 36
Şekil 2.6 MTT reaktifi eklendikten sonra, inkübasyon öncesi ve sonrasına ait görüntüler..... 38
Şekil 2.7 %80 doluluğa ulaşan mezenkimal kök hücreler 40
Şekil 3.1 Karayosunu türleri uygulanmış HCT116 kanser hücrelerinin morfolojik görüntüleri büyütme X100..... 42
Şekil 3.2 72. Saat sonunda hücre canlılığı (%) MTT testi ile belirlenmiştir. K1, K2 ve K3 ekstraksiyonu doza bağlı bir şekilde kolorektal kanser hücre dizisi HCT116'da belirgin hücre ölümünü indüklemiştir. Veriles, her koşul için üç bağımsız deneyden alınmıştır. Kontrol grubuna göre uygulanan karayosunu dozları istatiksel olarak değerlendirilmiştir (a-c) (**** p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05) 44
Şekil 3.3 Etil alkol çözücüsüyle hazırlanmış olan K1, K2, K3 karayosunlarının HCT116 hücre canlılığı..... 45
Şekil 3.4 K1, K2 ve K3 türlerinde en etkili IC_{50} dozları belirlendikten sonra mezenkimal kök hücrelerine uygulanmış ve 72. Saatin sonundaki canlılık oranları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. (**** p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05)..... 47
Şekil 3.5 Kontrol K1-K3 karayosunu ekstraktları ve sisplatin uygulanmış HCT116 hücrelerinden elde edilen FTIR grafikleri..... 48
Şekil 3.6 3300-2800 cm^{-1} aralığı ayarlanmış lipit bölgesi karayosunu gruplarının HCT116 hücrelerine uygulanması sonucu görülen FTIR pik değerleri ve anlamları..... 49
Şekil 3.7 1800-1200 cm^{-1} aralığı ayarlanmış protein bölgesi karayosunu türlerinin HCT116 hücrelerine uygulanması sonucu görülen FTIR pik değerleri ve anlamları..... 50
Şekil 3.8 1200-900 cm-1 aralığı ayarlanmış nükleik asit bölgesi karayosunu gruplarının HCT116 hücrelerine uygulanması sonucu görülen FTIR pik değerleri ve anlamları..... 50

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1 Bazı antimikrobiyal maddelerin etki spektrumları 25
Tablo 2.1 Etil alkole ait relatif polarite ve kaynama noktası değerleri 30
Tablo 2.2 Toz haline getirilen karayosunlarının üzerine eklenen etil alkol miktarları 32
Tablo 2.3 K1, K2, K3 karayosunu türlerine uygulanan doz konsantrasyonları 36
Tablo 3.1 Kontrol grubu ile K1, K2 ve K3 karayosunu gruplarının ortalamalarının karşılaştırılması (sonuçlar ortalama ± SEM olarak verilmiştir) 44
Tablo 3.2 K1, K2, K3 karayosunu türleri ve sisplatin adlı kemoterapi ilacına ait IC_{50} değerleri 46
Tablo 3.3 Mezenkimal kök hücrelere ait kontrol grubu ile K1, K2 ve K3 karayosunu gruplarının ortalamalarının karşılaştırılması (sonuçlar ortalama ± SEM olarak verilmiştir) 47
Tablo 3.4 Kontrol (HCT116), sisplatin ve karayosunu ekstreleri uygulanmış HCT116 hücrelerinin spektrumlarında elde edilen en önemli bantlar atanmış hücresel bileşenlerle titreşim türleri ve pik değerleri 52
Tablo 3.5 İnsan HCT116 kolorektal kanser hücre gruplarında seçilen hücresel bileşenler için absorbans yoğunluğu katsayılarının özeti ... 54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	**:** Mikro
%	**:** Yüzde
∑	**:** Toplam

Kısaltmalar

ABD	**:** Amerika Birleşik Devletleri
AJCC	**:** Amerikan Kanser Ortak Komitesi
ATCC	**:** Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
A431	**:** İnsan Epidermoid Karsinomu
A549	**:** İnsan Akciğer Karsinomu
B16-F10	**:** Fare Melanom Hücre Çizgileri
C6	**:** Sıçan Galioma Hücreleri
C-33A	**:** Servikal Hücre Hattı
CACO-2	**:** İnsan Kolorektal Karsinomu
CIMP	**:** CpG Adası Metilatör Fenotipi
CIN	**:** Krozomal instabilite
COLO320-HSR	**:** Kolon Kanseri Hücre Hattı
DMSO	**:** Dimetil Sülfoksit
DNA	**:** Deoksiribo Nükleik Asit
DNMT	**:** DNA Metil Transferaz
EA	**:** Etil Asetat
FAP	**:** Ailesel Adenomatos Polipozis
FBS	**:** Fetal Boyal Serum
FT-IR	**:** Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HCT116	**:** Kolon Kanser Hücre Hattı
HL-60	**:** Lösemi Hücre Hattı
HNPCC	**:** Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanser
IARC	**:** Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu
K1	**:** *Syntrichia ruraliformis*
K2	**:** *Hypnum andoı*
K3	**:** *Plathypnidium riparioides*
KB	**:** Oro-laringal Skuamöz Karsinoma
KRK	**:** Kolorektal Kanser
LS174	**:** Kolon Kanseri Hücre Hattı
MCF-7	**:** İnsan Meme Adenokarsinom Hücre Hattı
MERLAB	**:** Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
MKH	**:** Mezenkimal Kök Hücre
MSI	**:** Mikrosatellit İnstabilite

MTT	**:** 3-[4,5-dimetil tiyazol-2-yl]-2,5 Difenil Tetrazom Bromid
NCI-H358	**:** Akciğer Hücre Hattı
PA1	**:** Yumurtalık Hücre Hattı
PBS	**:** Fosfat Tamponlu Salin
PTM	**:** Histon Kovalent Translasyonu Sonrası Modifikasyon
RNA	**:** Ribo Nükleik Asit
SRB	**:** Sülforodamin B
TNM	**:** Tümör, Lenf Nodu, Metastaz
TSG	**:** Tümör Baskılayıcı Gen
WHO	**:** Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1 Kanser

Kanser hücresel DNA'daki bilgiler bozulduğunda ortaya çıkan ve gen ekspresyonunun anormal şekillerine yol açan genetik bir hastalıktır. Değişimin ana mekanizması, mutasyonların birikimidir. Hücre bölünmesi, apoptoz, lokal ve uzak istila ile vücudun bağışıklık sisteminin zayıflamasını içeren bir dizi genetik değişiklik; hücrelerin ve dokuların normal özelliklerinin temel değişikliklerine yol açar. Kanser günümüzde, Türkiye de dahil olmak üzere bir çok ülkede, ölüme neden olan hastalıklar arasında ilk sıralarda gelmektedir. Türkiye'deki kanser oranı, dünyadaki orana bakıldığında daha yüksekken, Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmiş ülkelere kıyasla hem kadınlarda, hem de erkeklerde daha düşük bir seyirde ilerlemektedir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumunun (IARC) 2030 yılı için düşünceleri, kanserin ölüm sebebi arasında ilk sıraya yükseleceği yönündedir (Harrington, 2016; Murshed, 2019; Oylar ve Tekin, 2011).

Mutasyonlar tekrarlanan hücre bölünmesinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkar. DNA yüksek doğrulukta çoğaltılmış olmasına rağmen, genomun büyüklüğü ve hücre bölünmesi sayısı göz önüne alındığında organ gelişimi için, rastgele hatalar kaçınılmazdır. Tekrarlayan insan genomundaki birçok dizinde hatalara katkıda bulunur. DNA sentezi sırasındaki 'kayma' küçük eklemelere ve silmelere neden olabilir. Genomda bulunan kısa homoloji uzantılarıyla amplifikasyonlar, silmeler ve yer değiştirmelere teşvik edilebilir. Normal hücresel işlemlerde mutasyon yüküne katkıda bulunabilir. Çünkü, reaktif oksijen türleri gibi doğal metabolizma ürünleri, DNA hasarına neden olabilir. Dışsal faktörler ayrıca kanser gelişiminde önemli rol oynar; bireyin radyasyona, kanserojenlere ve diğer çevresel faktörlere maruz kalması bu sebepler arasında sıralanabilir. Bununla birlikte, pediatrik kanserler de dahil olmak üzere kanserlerin çoğunluğu, edinilmiş mutasyonların bir sonucudur. Patojenik germline mutasyonlarının kanser riskini büyük ölçüde arttırdığı ve pediatrik vakaların % 10'unun altında kaldığı, orantısız bir şekilde adrenokortik tümörlere, osteosarkom ve akut lenfositik lösemiye katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir. Kanser,

onkogenler ve iki gen sınıfı tarafından tetiklenir ve tümör baskılayıcı genlerin (TSG'ler) her biri normal hücrelerde işlev görür. Onkogenler, hücre çoğalmasını, hayatta kalma ve istila / hareket kabiliyetini kontrol eden normal hücresel genlerin mutasyona uğramış halinden türetilir. Normal hücrelerde, proto-onkogenlerin ekspresyonu, kontrolsüz hücre büyümesinin önlemek için çok dikkatli bir şekilde düzenlenir. Kanserde aktive edici proto-onkogenler, kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmakta, yayılmayı sağlamaktadır. Onkogenler, proto-onkogenin tek bir mutasyona uğramış kopyasının kansere teşvik etmek için yeterli olduğu ve genellikle kanser sendromları ile ilişkili olmadığı için fenotopik olarak baskın olarak tanımlanmaktadır. Bu kuralın istisnaları, RET proto-onkogenindeki çoklu endokrin neoplazia sendromları ile ilişkili mutasyonlar ve H-RAS'da ki Costello sendromuna neden olabilecek germline mutasyonları içerir. Onkogenler, kansere neden olmak için üç şekilde aktive edilir;

1. Gen mutasyonları, gelişmiş biyolojik fonksiyon vermek üzere bir genin sırasını değiştirir.

2. Gen amplifikasyonu, bir gen normal sekansını koruduğunda meydana gelir.

3. Gen translokasyonu, genetik bir dizinin normal kromozamal konumundan, yeni bir pozisyona, daha aktif bir promotör element tarafından kontrol edildiği veya yeni bir füzyon proteini ürettiği hareketi içerir (Harrington, 2016; Strong, 2018).

TSG'ler hücreyi inhibe eden normal hücre genleridir. Bunlar genellikle hücre döngüsünün ilerlemesini ve programlanmış hücre ölümünü kontrol altına alırlar. TSG'ler fenotipik olarak resesiftir, yani her iki kopyanında (alel) kansere teşvik etmek için fonksiyonel olarak değiştirilmesi gerekir ve kalıtsal sendromlardan sorumludur. Ailesel kanser sendromların da, bireyler bir TSG'nin kopyasında bir germline mutasyonu miras alırlar bundan vücuttaki her hücre etkilenir. Sonuç olarak, kalıtsal kanser sendromları sıklıkla yaşamın erken dönemlerinde çoğul kansere neden olur. Kanser teşhisi koyulması, bireyler için oldukça sıkıntılı geçen bir dönemdir. İlk zamanlarda verilen en fazla tepkiler inanamama ve şoktur. Bu zaman diliminde

koyulan kanser tanısı, hasta bireyler adına kabullenmesi zor olan bir durumdur. Hastalar kanser teşhisinden kaynaklanan endişe ve çaresizliğe yenik düşerler. Bundan sonra depresyon ve öfke gelişebilir. Zaman geçtikçe bireyin hastalığı kabullenip, hayata pozitif bakmasıyla kabullenme süreci başlar. Tedavi programının anlatılması ve tedavi seklinin belirlenmesi kabullenilmeyi sağlar (Harrington, 2016; Özkan, 1999).

1.1.1 Kolon Kanseri

Kolorektal kanser, kadınlarda ve erkeklerde benzer insidans oranıyla küresel olarak en yaygın kanserlerden biridir. Geniş bir morbidite ve mortalite oranıyla dünya çapında her yıl, bir milyondan fazla yeni kolorektal kanser (KRK) vakası teşhis edilmektedir. Kolon kanseri çoğunluğu sporadik olarak görülmekle beraber, kalıtımsal mutasyon belirlenmemiştir. Epitel hücrelerde gerçekleşen genetik-epigenetik değişikliklerden kaynaklandığı gibi, tümör stroma ilişkisinin ve tümörün bulunduğu mikroçevrenin, tümöre karşı meydana gelen immün yanıtın, kolon kanseri patogenezinde önemli bir yer tuttuğu da bilinmektedir (McLean vd. 2011; Parizadeh vd. 2019).

1.1.2 Kolon Kanserinde Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik, nükleotit sekansını değiştirmeden gen ekspresyonundaki değişikliklerdir. Kansere bağlı genlerin hem aktivasyonu, hem de inaktivasyonu epigenetik mekanizmalarla meydana gelebilir. Bu değişikliklerden birkaç mekanizma sorumludur. Son on yılda birçok çalışma, insan kanserlerinde tüm epigenetik değişikliklerin kapsamını ve bunların tümör gelişimine ve ilerlemesine aktif katkıları üzerine olmuştur. Birçok araştırma, DNA metilasyonundan, geniş bir histon modifikasyonu dahil olmak üzere geniş bir alan kapsayan ‘epigenom’ a odaklanmıştır. DNA metilasyonu, özellikle promatör metilasyonu, embriyonik gelişim, baskılama ve doku farklılaşması gibi insan dokularındaki birçok hayati sürece dahil edilmesi için kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. 5-metil sitozin üretmek için 5’s sitozin pozisyonuna bir metil grubunun eklenmesinden sorumlu olan DNA metil transferazların (DNMT’ler) enzimatik aktivitesi ile oluşur.

Bu ilavenin sonucu, genlerin ve kodlama yapmayan bölgelerin bastırılmasıdır. DNMT' ler, DNA replikasyonu sırasında normal metilasyon şablonlarını koruyan bir bakım aktivitesine veya orijinal metilasyon şablonunu modifiye eden bir novo aktivitesine sahip olabilir. İnsanlarda ve diğer memelilerde bu ilave, CpG dinükleotitlerinde meydana gelir. Metillenmiş CpG dinükleotitleri genellikle gen gövdelerinde ve genellikle sentromer ve diğer retrotranspozon elementlerinde tanımlanan büyük tekrarlayan dizilerde bulunur. Bununla birlikte, CpG adaları (CpGI) olarak adlandırılan CpG olarak son derece zengin bazı bölgeler, genellikle onkosupresör genleri olmak üzere, tüm gen promotörlerinin yaklaşık %60-70'inde bulunur. Kanser gelişimi sırasında, CpGI metilasyon paterni değiştirilmiş, genom çapında hipometilasyon ve bölgeye özgü CpG adası hipermetilasyonu göstermiştir. Genellikle, bu tür büyük tekrar eden kısımlar, retrotranspozonları ya da intronlar gibi bölgelerin hipometilasyonu, genomik kararsızlığına neden olur. CpG adalarına yakın bölgelerde bulunan ve daha düşük CpG yoğunluğu olan kolon kanseri CpG ada kıyılarındaki metilasyon değişikliklerinin kolon kanserinde sık olduğunu ve gen baskısıyla güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu kanıtlanmıştır.

Histon kovalent translasyonu sonrası modifikasyon (PTM) en yaygın ikinci epigenetik mekanizmadır. Çekirdek histonları, H2A, H2B, H3, H4, kromatini paketleyen ve transkripsiyonu baskılayan nükleozomu oluşturmak için etrafına 147 DNA baz çiftinin sarıldığı bir oktamerik kompleks oluşturur. Bazı enzimler, histonun N-terminal kuyruklarını değiştirebilir metil, fosforil, metil grupları gibi küçük kimyasal modifikasyonların translasyon sonrası eklemesini katalize eder. Bu PTM'ler, kromatin yapısını değiştirerek veya apoptoz, DNA replikasyonu, DNA hasarı tepkisi de dahil olmak üzere birkaç işlemi etkileyen histon değiştiricileri işe alarak gen aktivitesini etkileyebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı kilit tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde, KRK'nın epigenetik ve genetik değişiklikler nedeniyle ortaya çıktığını göstermektedir. Genel olarak KRK'nın gelişmesinde üç anagenomik instabilite yolu tarif edilmiştir: krozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilitesi (MSI), ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP). CIN'li KRK'lar kromozomal kazançlar ve kayıplar ve anöploidi ile karakterize edilir. MSI olanlar, tekrarlayan DNA dizilerinde sık sık ekleme ve silme mutasyonu varlığı ile tanımlanır. CIMP pozitif KRK'lar, 8 markörün CpG adalarında (RUNX3, MLH1, NEUROG1, CDKN2A, IGF2, CRABP1, SOCS1,

ve CACNA1G) bulunan küresel bir genom hipermetilasyonu ile karakterize edilir. CIMP- pozitif tümörler, KRK'nın %15'ini temsil eder ve CIMP, spesifik bir gen ekspresyon profili ile önemli ölçüde ilişkili olmasına rağmen daha da kötüsü MSI tümörleri ile kısmen örtüşür (Armaghany, 2012; Banerjee, 2009; Berger, 2011; Grunstein,1990; Jones, 2007; Kouzarides, 2007; Okugawa, 2015; Porcellini, 2018; Rodriquez-Paredes, 2011).

1.1.3 Kolon Kanserinin Epidemiyolojisi

Kolon kanseri, gastrointestinal sistemde en çok görülen kanserlerden olmakla birlikte diğer kanser çeşitleriyle karşılaştırıldığında %9'luk görülme oranına sahiptir. Amerika Birleşik Devletlerinde neredeyse her yıl 138.200 kanserli vaka oluşmakta ve bu sayının %73,4'ünü kolon kanseri oluşturmaktadır.

Ülkemize bakıldığında, Sağlık Bakanlığının 2003'te yaptığı araştırmalarına göre meme ve akciğer kanserlerinin ardından üçüncü sırada gelmekle birlikte insidansı 5,41 / 100 000 olarak bilinmekte ve kolorektal kanserin erkeklerde ve kadınlarda görülme oranı Türkiye'de üçüncü sırada görülmektedir. Kolorektal kanser geniş bir yayılım göstermektedir. Avustralya, Yeni Zelanda, Kuzey Amerika, Japonya ve Batı Avrupa'da geniş bir dağılım gösterirken; Afrika, Asya ve Güney Amerika'da daha düşük dağılım göstermektedir (Akkoca ve Yanık, 2014; Ashktorab, 2009; Coşun vd. 2012; Özkan ve Kaya, 2012; Terzi ve Ünek, 2004).

1.1.4 Kolon Kanserinin Risk Faktörleri

1. Kırmızı etin fazla tüketilmesi,
2. Yaş faktörü,
3. Sigara ve alkol tüketimi,
4. Beslenme olarak batı şeklinde beslenme,
5. Diyabet,

6. Obezite,

7. Fazla radyasyona maruz kalma,

8. Uzun süren barsak hastalığı (Ames, 1983; Frezza vd 2006).

1.1.5 Kolon Kanserinin Etiyolojisi

Gelişimi tam olarak bilinmemekle birlikte kolorektal kansere etki eden bazı risk faktörleri bulunmaktadır. Bir bireyin kontrol edemediği faktörler yaş ve kalıtsal faktörleri içerir. Bununla birlikte çevresel ve yaşam tarzı risk faktörleri, kolorektal kanserin gelişiminde önemli rol oynar (Haggar, 2009).

1.1.5.1 Yaş

Kolorektal kanser riski, 40 yaşından sonra artmakla birlikte, 50 yaşından sonra kesin bir şekilde artar. Kolorektal kanser vakalarının %90'ından fazlası 50 yaş ve üstü kişilerde görülür. İnsidans oranı, 60-79 yaşları arasındakilerde, 40 yaşın altındaki kişilere göre 50 kattan daha yüksektir. Ancak gençler arasında kolorektal kanser oranı artmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde, kolorektal kanser, 20 ile 49 yaş arasındaki kadın ve erkekler arasında en sık teşhis edilen on kanserden biridir (Fairly ve Cardinez, 2006; Ries ve Harkins, 2006).

1.1.5.2 Adenomatoz polip geçmişi

Kolorektumun neoplastik polipleri, yani, tübüler ve villöz adenomlar, kolorekral kanserin prekürsör lezyonlarıdır. ABD'de yaşam boyu bir kolorektal adenom gelişme riski yaklaşık %19'dur. Sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %95'i gelişir. Bu adenomlardan, adenom öyküsü olan bireylerde, adenom öyküsü olmayan bireylerden daha fazla kolorektal kanser riski görülür. Adenomlardan malignite gelişim için genellikle 5 ile 10 yıl olarak tahmin edilen uzun gecikme süresi gerekir. Malign transformasyondan önce bir adenom saptanması ve çıkarılması kolorektal kanser riskini azaltabilir (De Jong ve Morreau, 2005; Grande ve Milito, 2008; Jarnout ve Kollarova, 2001; Labian ve Beretta, 2005).

1.1.5.3 İnflamatuar bağırsak hastalığı geçmişi

İnflamatuar bağırsak hastalığı (İBH), ülseretif kolit ve Crohn hastalığını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Ülseratif kolit, kolon ve rektum mukozasında iltihaplanmaya neden olur. Crohn hastalığı, bağırsak duvarının tam kalınlığının iltihaplanmasına neden olur ve ağızdan anüse kadar sindirim kanalının herhangi bir bölümünü içerebilir. Bu durumlar bireyin genel olarak kolorektal kanser geliştirme riskini arttırmaktadır. İnflamatuar barsak hastalığı olan hastalarda kolorektal kanser riskinin 4-20 kat arasında olduğu tahmin edilmiştir (Jarnout ve Kollarova, 2001).

1.1.5.4 Kolorektal kanser veya adenomatoz polip geçmişi

Kolorektal kanser vakaları genelde ailesinde kolorektal kanser öyküsü olmayan kişilerde ortaya çıkmakla birlikte, kolorektal kanser gelişen kişilerin %20'sinde bu hastalıktan etkilenen diğer aile üyeleride vardır. Birinci derece akrabalarında kolorektal kanser veya adenomatoz polip öyküsü olan kişilerde, 60 yaşından küçük akrabalarında kolorektal kanser veya adenomatoz polip öyküsü olan kişilere göre risk daha yüksektir. Riskin artmasının nedenleri açık olmamakla birlikte kalıtsal genler, paylaşılan çevresel faktörler veya bunların bir kombinasyonundan kaynaklanıyor olabilir (Boardman ve Morlan, 2007).

1.1.5.5 Kalıtsal genetik risk

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %5 ile 10'u bilinen kalıtsal koşulların bir sonucudur. Kalıtımsal en yaygın koşullar ailesel adenomatous polipozis (FAP) ve kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanserdir (HNPCC), Lynch sendromu olarak da adlandırılır. Kalıtsal kolorektal kanser türlerinden sorumlu olan genler tanımlanmıştır. DNA onarım yolağı genlerindeki mutasyonlarla ilişkili olan MLH1 ve MSH2, bireylerde HNPCC sorumlu olan genlerdir. HNPCC, kolorektal kanserlerin % 2 ile 6'sını oluşturabilir. HNPCC ile ilişkili mutasyonlara sahip kişilerde yaşam boyu kolorektal kanser riski % 70 ile 80 arasında olabilir. Böbrek, üreter, FAP tüm kolorektal kanser vakalarının % 1'inden azını oluşturur. Sadece bir kaç adenom geliştiren HNPCC'li bireylerin aksine, FAP'lı bireyler genç yaşta yüzlerce polip geliştirir ve bu adenomların bir veya daha fazlası malign transformasyona uğrar. APC

(tümör baskılayıcı gen) ile ilişkili polipoz koşulları otozomal dominant olarak kalıtılır ve bireylerin yaklaşık %75 ile 80'i APC birleşik polipoz koşullarından etkilenir. Bir ailede hastalığa neden olan bir mutasyon tanımlanırsa, prenatal test ve preimplantasyon genetik tanı testi yapılır (Davies ve Miller, 2005; Lynch ve Lynch, 2008).

1.1.5.6 Çevresel risk faktörleri

Kolorektal kanserde çevresel risk faktörlerini bireyin kültürel, sosyal ve yaşam tarzı faktörleri içermektedir. Kolorektal kanser, değiştirilebilir nedenlerin kolayca tespit edilebildiği kanserlerden biridir ve teorik olarak önlenebilir. Yapılan bir çalışmada düşük riskli ve yüksek riskli ülkelere göçenler arasında, kolorektal kanserin görülme oranları, ev sahibi ülkenin nüfusuna doğru artma eğilimindedir. Örneğin, Güney Avrupa'dan Avustralya'ya göçen ve Japonya'dan Hawaii'ye göçen göçmenler arasında kolorektal kanser riski menşei ülke nüfusuna kıyasla artmıştır. Aslında, Japon göçmenlerin Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çocuklarının kolorektal kanser insidansı, şu anda beyaz popülasyonlardakilere yaklaşmakta veya aşmaktadır ve Japonya'daki Japonlara göre üç veya dört kat daha yüksektir. Kolorektal kanser insidansındaki farklılıkları etkileyen başka bazı coğrafi faktörler vardır. Bunlardan biri kentsel konuttur. İnsidans kent sakinleri arasında daha yüksektir. Kentsel alanlardaki bu aşırı insidas, erkekler arasında kadınlardan daha fazla ve kolon kanseri, rektum kanserinden daha belirgindir (Boyle ve Langman, 2000; Johnson ve Lund, 2007).

1.1.5.7 Beslenme uygulamaları

Diyet, kolorektal kanser riskini güçlü bir şekilde etkiler ve gıda alışkanlıklarındaki değişiklikle bu kanser yükünün %70'i azaltabilir. Yağ oranı yüksek besinler, özellikle hayvasal yağ, kolorektal kanser için önemli bir risk faktörüdür. Yağın olası bir etiyolojik faktör olarak gösterilmesi, safra tuzlarını potansiyel olarak kanserojen N-nitroso bileşiklerine parçalayabilen bir bakteri florasının gelişimini destekleyen tipik batı diyeti konseptiyle bağlantılıdır. Tüketim kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaktadır. Et tüketimiyle pozitif ilişki, kolon kanseri için rektal kanserden daha güçlüdür. Bazı çalışmalar meyve ve sebzelerde düşük diyet yapanların kolorektal

kanser riskinin daha yüksek olabileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra diyet lifi alımının artmasının, dışkı içeriğini seyreltmesi, dışkı kütlesini arttırması ve geçiş süresini azaltabileceği görülmüştür (Jornout ve Kollarova, 2001; Sinha, 2002).

1.1.5.8 Fiziksel aktivite ve obezite

Yaşam tarzıyla ilgili çeşitli faktörler koloraktal kanserle ilişkilendirilmiştir. Değiştirilebilir ve birbiriyle ilişkili iki risk faktörünün, fiziksel hareketsizliğin ve aşırı vücut ağırlığının, kolorektal kanserlerin yaklaşık dörtte birini oluşturduğu bilinmektedir. Düzenli fiziksel aktivite ve sağlıklı beslenme, kolorektal kanser riskini azaltmaya yardımcı olur. Fiziksel aktivite azalması ve kolorektal kanser arasındaki ilişkiden sorumlu olan biyolojik mekanizmalar araştırılmıştır. Uzun süreli, düzenli aktiviteler metabolik hızı ve maksimum oksijen alımını arttırır. Uzun vade de, bu aktivitenin düzenli yapılması, vücudun metabolik etkinliğini ve kapasiteni arttırmanın yanı sıra, kan basıncını ve insülin direncini azaltır. Günlük rutinlerde fiziksel aktivite olmayışı, kolorektal kansere bağlı başka bir faktör olan erkek ve kadınlarda artmış olan obeziteye bağlanabilir. Aşırı kilolu veya obez olmak, dolaşımda artan östrajen, azalmış insülin duyarlığı ve birçok biyolojik korelasyonunun kanser riskini etkilediği düşünülmektedir. Çalışmalar, enerjiyi daha verimli kullanan bireylerin kolorektal kanser riskinin daha düşük olabileceğini göstermektedir (Boyle ve Langman, 2000).

1.1.5.9 Sigara kullanımı

Sigara içiciliği ile akciğer kanseri arasındaki ilişki çok iyi bilinmekle birlikte, sigara içilmesi kolon ve rektumada son derece zararlıdır. Araştırmalar, kolorektal kanser ölümlerinin %12'sinin sigaraya atfedildiğini göstermektedir. Tütünde bulunan kanserojenler, kolon ve rektumdaki tümör büyümesini arttırır. Kolon ve rektumda bulunan büyük polipler uzun süreli sigara içiciliği ile ilişkilidir. Araştırmalar ayrıca sigara içen kadın ve erkeklerde kolorektal kanser insidansının erken yaşlarda ortaya çıktığını göstermektedir (Botteri ve Lodice, 2008; Zisman ve Nickolov, 2006).

1.1.5.10 Ağır alkol tüketimi

Sigarada olduğu gibi, düzenli alkol tüketimi, kolorektal kanser geliştirme riski ile ilişkili olabilir. Alkol tüketimi, genç yaşta kolorektal kanser başlangıcının bir faktördür ve distal kolondaki tümörlerin orantısız bir şekilde artmasına neden olmaktadır. Asetaldehit gibi alkolün reaktif metabolitleri kanserojen olabilir. Ayrıca sigara içimi ile etkileşimi de vardır. Tütün, alkol varlığında DNA'da spesifik mutasyonlara neden olabilir. Alkol, diğer kanserojen moleküllerinin mukozaya nüfuz etmesini arttıran bir çözücü olarak da işlev görür. Bunula birlikte, alkol lipid peroksidasyonu ve serbest radikal oksijen türlerinin üretilmesi aracılık edebilir. Son olarak, yüksek alkol tüketicileri temel besin maddelerinde düşük beslenerek dokuları kanserojen maddeye duyarlı hale getirilebilir (Pöschl ve Seitz, 2004).

1.1.6 Kolon Kanseri Histolojik Alt Tipleri

Kolorektal kanser:

1. Adenokarsinom,
2. Musinöz adenokarsinom,
3. Skuamoz diferansiye olmayan karsinom,
4. Nöroendokrin diferansiasyon gösteren adenokarsinom,
5. Nöroendokrin tümörler'den kaynaklı olabilmektedir (Kaya, 2008).

1.1.7 Kolon Kanserinin Tanısı ve Kullanılan Yöntemler

Kolonoskopi: Bu yöntem ile bağırsak yüzeyinde bulunan poliplerin çıkarılması ve senkron neoplazmların saptanabilmesi sağlanır. Bunun yanında poliplerin çıkarılması ve kolon kanserinde tedavi olanağı sağlaması nedeniyle tercih edilmektedir (Mulder ve Kranse, 2011).

Ultrasonografi: Rektum tümörlerinin evrelendirilmesi ve karaciğer metastazlarının belirlenmesinde kullanılır (Candar, 2018).

Bilgisayarlı Tomografi: Tümörün bölgesel genişlemesinde, adenopati ve uzak metastazları göstermesi açısından ve anatomik ilişkileri değerlendirmede önemli bir yere sahiptir (Horton ve Abrams, 2000).

1.1.8 Kolon Kanserinde Evrelendirme

Literatürde kolorektal karsinoma için bir dizi derecelendirme sistemi önerilmesine rağmen, tek biçimli bir standart hala mevcut değildir. Önerilen derecelendirme sistemleri arasında, hem lenf nodlarının sayısı, hem de bunların arasında ayrım yapmak için kriterler belli değildir. Bazı sistemlerde, sınıf, salgı bezi oluşum derecesi gibi tek bir mikroskobik özellik temelinde tanımlanır. Diğer sistemlerde değerlendirmeye çok sayıda histopatolojik dahil edilmiştir. Bununla birlikte, çoğu sistem tümörleri şu şekilde üç veya dört dereceye göre sınıflandırır:

- Derece 1: iyi farklılaştırılmış
- Derece 2: orta derecede farklılaştırılmış
- Derece 3: kötü farklılaştırılmış
- Derece 4: farklılaşmamış

Belirli bir derecelendirme sistemi olsa bile, normal olarak bireysel histolojik özelliklerin görünümünde karşılaşılan değişiklikler, en basit derecelendirme sistemlerinin bile uygulanmasını sorunlu hale getirebilir. Bugün kolorektal kanserde sınıflama için 3 farklı yöntem kullanılmaktadır.

- Duke’s sınıflaması
- TNM sınıflaması

- Astler-Coller sınıflaması

Duke's sınıflaması; lenf nodu yayılımına bakılarak ve tümörün derinliğine göre A, B, C evreleri olarak ayrılır. Astler-Coller sınıflaması; Duke's sınıflamasına benzemektedir. Bu sınıflamadan farklı olarak, derinlikleri farklı tümörlerde lenf nodu tutulumunu da gösterir. Uzak metastaz varlığını göstermek için, Duke's ve Astler-Coller sınıflamasına D evresi eklenmiştir. TNM sınıflaması; yıllar boyu kolorektal kanser için çok sayıda evreleme sistemi geliştirilse de, Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC), Kansere Karşı Uluslararası Birlik (UICC), Amerikan Patologlar Koleji tarafından TNM (tümör, lenf nodu, metastaz) evreleme sisteminin kullanımı önerilmektedir. TNM siteminde, 'T', primer tümörün ilk rezeksiyonu anlamına gelir. 'N' işareti bölgesel lenf bezlerinin durumunu belirtir ve 'M', uzak metastazı ifade eder (Angell ve Galon, 2013; Compton, 1999).

1.1.9 Kolon Kanserinde Tedavi

Cerrahi Tedavi: Kolon kanserinin tedavisinde, cerrahi yöntem uygulayabilmek için tümörün diğer organlara yayılmamış olması gerekmektedir. Bu yöntemde tümör etrafındaki sağlam dokuyla birlikte çıkarılmaktadır. Cerrahi tedavi, kanser tedavisinde temel yöntemlerdendir

Radyasyon Tedavisi: Enerjisi yüksek ışınlarla, kanserli hücrelerin hasara uğratılmasıdır. Lokal bölgelerde uygulanmaktadır ve oraya etki etmektedir. Ameliyat öncesinde ve sonrasında tümörlerin küçültülmesi ve tamamen kaldırılması için kullanılmaktadır.

Kemoterapi: Kanserli hücrelerin ilaç yardımıyla hasara uğratılmasıdır. Hastalığın ilerlemesinin engellenmesi ve tümörün küçültülmesi için bu yöntemden yararlanılmaktadır.

Biyolojik Tedavi: Kansere karşı bireyin immün sisteminin güçlendirilmesidir. Diğer bir adı da immunoterapidir (Motemadian, 2017).

1.1.10 Kolon Kanseri Patolojisi

Kolon kanserinin patolojisi, hastalığın tedavisinde, ilk tanıdan tedaviye kadar kritik bir unsurdur. Ameliyat öncesinde ya da sonrasında ortaya çıkan tümörle ilgili özelliklerin değerlendirilmesinde en doğru yöntemdir. Patolojik evreleme, kolorektal kanserde en güçlü tek progmostik göstergedir ve birçok durumda, tedavinin uygunluğunuda belirler. Kolorektal kanserde, diğer hastalıkların çoğunda olduğu gibi, patolojik değerlendirmenin doğruluğu ve eksizliği, patoloğun klinik ve operatif veriler hakkındaki farkındalığına bağlı olabilir. Kolorektal kanserlerin genelini adenokarsinom oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra;

- Karsinoid tümörler
- Skuamöz hücreli karsinom
- İndiferansiye karsinom
- Adenoskuamöz karsinom
- Sarkom ve lenfomalardan oluştuğuda bilinmektedir.

Kolorektal kanserde derecelendirme; hücresel dizilim ve tümörde, tübül gelişiminin derecesine bakılarak yapılır. Derece I: iyi differansiye ve kanserli bireylerin %15-20'sinde, Derece II: orta differansiye ve kanserli bireylerin %60-70'inde, Derece III: az differansiye ve kanserli bireylerin %15-20'sinde görülebilmektedir. Derece I; hücrelere bakıldığında uniformdur, polarite kaybı yok denilecek kadar azdır, adenoma epiteline benzemektedir. Derece II; tübüler yapılar karışık bir yapıda, düzensiz ya da daha basit bir yapıdadır. Az da olsa kayıplar olabilmektedir. Derece III: tübüler yapıların hepsi kaybolmuştur (Compton, 1999; Yıldız, 2008).

1.1.11 Kolon Kanserinde Tümör Yayılımı ve Metastaz

Kolorektal tümörler invazyon yayılımına sahiptirler. Kendine uzak organlara kan damarı ile ya da lenfatikler ile yayılabilirler. Karaciğer ve lenf nodları en çok metastaz

gösterdiği bölgeler olamkla birlikte; overler, periton ve akciğerlerde de görülme oranı fazladır. Nispeten daha az görüldüğü bölgeler ise; uterus, testis, santral sinir sistemi, oral kavite, kemiktir (Yıldız, 2008).

1.1.12 Kolon Kanserinde Adenom-Karsinom Dönüşümü

Her polip tümöre dönüşmemektedir. Polipin kolorektal kansere dönüşmesi için neredeyse 8-10 sene geçmesi gerekmektedir. Adenomlardan kolorektal kanserler meydana gelebilmektedir. 5 yılda %2,5; 10 yılda %8; 20 yılda %24'poliplerden adenom oluşmaktadır. Senkron polip riski, kolorektal kanserde %30'dur. Adenokarsinom ve adenomun, rektum ve kolonda görülme ihtimali %13-62'dir. Kolorektal karsinogenezde APC gen mutasyonu ilk aşamadır. APC geni, tümör baskılayıcı gendir. İnaktif hale gelmesi, hücrelerde proliferasyonun artışına neden olabilmektedir. Proliferatif özelliği artan hücrelerde CpG dinükleotitlerinin metilasyon kaybı meydana gelmesi, hücrelerin artmasına ve adenomların gelişmesine sebep olur (Öner, 2014).

1.1.13 Kolon Kanseri Kök Hücreleri

Son zamanlarda, kök hücre benzeri özelliklere sahip tümör başlatıcı hücreler veya kanser kök hücreleri olarak adlandırılan küçük bir kanser hücresi popülasyonunun, tümör büyümesinin başlatılmasından ve devam etmesinden sorumlu olduğuna dair araştırmalar vardır. Kolorektal kanser kök hücreleri, konvansiyonel kemo-radyoterapiye dirençlidirler ve tedavi sonrası nüksetmeden büyük oranda sorumludurlar. Kolorektal kanser kök hücrelerinin konvansiyonel tedaviye direnci ile ilgili olarak, kolorektal kanser kök hücrelerinin yok edilmesine yönelik tedavinin bireyin sağ kalımını olumlu etkileyebileceği bildirilmiştir (Parizadeh vd 2019).

1.2 Briyofita

Karayosunları, morfolojik olarak küçük bir yapıya sahip olduklarından ve saf numuneler elde etmek oldukça zor olduğundan araştırmacıların pek de dikkate almadığı bitkilerdir. Ağaçlarda, toprakta, nemli ormanların tabanında, kayalar üzerinde halı gibi bir görüntü oluşturarak biyo çeşitliliğin artmasına ve zengin besin

oluşumuna önemli katkı sağlamaktadırlar. Hemen hemen her ortamda yetişebilen karayosunlarının gametofitleri çok yıllıktır. Alpinik ve arktik bölgelerin önemli bitkilerindendir. Nemli ortamları genel olarak sevmekle birlikte, kurak ortamlarda yaşayabilen türleri de bulunmaktadır. Bunun yanında kirli havaya karşı da dayanıklıdırlar. Yaşamlarında üç nesil bulunmaktadır:

1. Protonema: İpliksi ve sürünücü yapılardır. Sporların çimlenmesi ile oluşmaktadırlar. Haploid yapıdaki protonema, gametofiti vermektedir.
2. Gametofit: Protonemadan gelişmektedir. Sürünücü ya da dik formdadır. Üzerinde yapraksı yapılar bulunan gövdelerden meydana gelmektedir. Eşeyli üreme gametofitte gerçekleşmektedir. Yaşam dögülerinde baskın evredir.
3. Sporofit: Gametofite bağımlı diploid nesildir. Döllenme sonucu oluşan embriyodan meydana gelmektedir. Mayoz bölünme sonucu haploid sporları verir.

Karayosunları gametofor veya gametofit olarak bilinen yapraklı gövdelere sahiptir. Bu yapılar bir araya gelerek, örtü şeklinde gruplar meydana getirir. Nemli soğuk yerlerde yaşayanlar diğerlerine göre tek tek veya daha seyrek bulunmaktadırlar. Vasküler bitkilerde kök, gövde ve yapraktan oluşan kısımlar sporofittir, karayosunlarının ise gövde ve yaprakları gametofittir. Bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda vasküler bitkilerin ve karayosunlarının gövde ve yaprakları, aynı şekilde dağılmamıştır. Kökenleri farklıdır. Karayosunlarının gametoforları, apikal hücre ile gelişir. Hücrelerin bölünmesi ve farklılaşması ile yapraklar ve gövde meydana gelmektedir. Gövdenin üstünde yapraklar, üç sıra şeklinde dizili bulunmaktadır. Yalnızca orta damar (kosta), yapraklarda bulunmaktadır. Kosta ve kenarları hariç yapraklar bir hücre tabakasından meydana gelmektedir. Genellikle yaprakların üst kısmında kutikula bulunmaktadır. Alt kısmında ise, çiyden, yağmurdan ve sisten doğrudan su emme özelliği bulunmaktadır. Yukarıdan aşağıya doğru, sis, çiy ve yağmur geldiğinde bir taşıma söz konusudur. Aşağıdan yukarıya su taşıması karayosunlarında ender görülmektedir. Gövdeden yapraklara su taşıması, vasküler sistem olmadığı için görülmez. Kuraklığa karşı dayanıksızlardır. Çünkü yapraklarında yeterli kutikula bulunmamaktadır. Doku farklılaşması, yapraklarında çok az bulunmaktadır. Bu yüzden, yüzeysel hücre tabakası epidermis olarak tanımlanmaz.

Korteks denilen bu gövdenin yapısı tek düzedir. Doku farklılaşması ileri formlarda az da olsa bulunmaktadır. Gövde sürünücü alt yüzeyinde küçük, gametofitlerinin gövdesinin tabanında rizoid adı verilen yapılar bulunmaktadır. Bu yapılar, substrata gametofitlerin tutunmasını sağlamaktadır, ancak mineral ve su absorbsiyonu yapamazlar. Karayosunlarında dışsal su taşınımı vardır ve kapillar yollarla sağlanmaktadır. Büyük kısmında hidroid yoktur. Yapraklar ve gövde arasında çok dar kanalcıklar oluşmaktadır. Bunun sebebi, yapraklar ve gövdenin küçük olmasıdır. Kurak olduğu zamanlarda kapillar özellik daha da artar. Sis, çiy ve yağmurdan daha hızlı su emerler. Hidroid bulunduran türlerde, çevrelerinde vasküler bitkilerin kalburlu hücrelerine benzeyen hücreler bulunmaktadır. Bu hücrelere leptoid adı verilmektedir ve boyuna uzamış haldedirler. Organik maddelerin taşınmasını sağlamaktadırlar. Olgun leptoidde nukelus bulunmaktadır, fakat sitoplazma bulunmaktadır (Asakawa ve Ludwiczuk, 2013; Yıldız ve Aktoklu, 2012).

1.2.1 Karayosunlarının Özellikleri

Türkiye, kendisine yakın diğer ülkelerle karşılaştırıldığında önemli ve çok çeşitli bir bitki örtüsüne sahiptir.

- Üç bitki çeşitliliğine sahip bölgenin kesiştiği yerde olması,
- Farklı ortam koşulları ve farklı iklim tiplerine sahip olması,
- Güney Batı Asya ve Güney Avrupa arasında olması,
- Jeolojik, jeomorfolojik çeşitlilikler etken olmaktadır.

Bu özellikleri sayesinde çok fazla cins ve seksiyonun köken aldığı yer olması ve farklılaşma merkezinin Türkiye olmasına sebep olmuştur. Karayosunları evrimsel olarak bakıldığında, mantarlardan ve alglerden daha gelişmiş, çiçekli bitkilerden ve eğreltilerden daha ilkeldirler. Karasal bitki topluluğunun en büyük ikinci grubunu oluşturmakla birlikte, bryofitler;

- Ciğer otları,
- Boynuzsuz ciğer otları,
- Karayosunlarınıda içine alan çok geniş bir bitki topluluğudur.

Ekosistemin önemli bir parçası olan briyofitlerin, potansiyelini belirlemeye yönelik çalışmalar Türkiye'de giderek artmaktadır. Güneydoğu Anadolu, briyofitler açısından en çok araştırılan bölgeler arasında olmasına rağmen, hala briyofitler için araştırılması gereken birçok alan vardır. Epiftik briyofit türlerinin dağılımını etkileyen en önemli faktörler arasında; ormanlık yaşı, ağaç yaşı, ağaç türleri ile ağaç kabuğu fiziksel ve kimyasal özellikleri ve mikro iklimlendirme gelmektedir (Başer, 2016; Dikmen ve Keçeli, 2017; Erdağ ve Kürschner, 2017; Kırmacı ve Ağcagil, 2018; Mezaka ve Znotina, 2006; Mezaka ve Brümelis, 2008).

Bryofitler deniz dışında dünyanın her yerinde bulunabilirler. Islak toprakta veya kayada, ağaçların gövdesinde, gölde, nehirde ve Antartika adasında bile yetişebilirler. Boyları genelde 20-30 cm arasında olsa da 1 m'ye kadar çıkabilir. Briyofitlerin dünyadaki sayısı yaklaşık olarak 18500'dür. Ülkemizdeki literatür geçmişine bakıldığında ise yaklaşık sayısı 934'tür (karayosunu 760, ciğerotu 171, boynuzsu ciğerotu 3). Bryofitler çok geniş alanda yayılım göstermektedirler, bu özelliklerinde anatomik ve morfolojik uyumları etkili olmaktadır. Günümüz florasında hala hayatta kalmalarını yapılarında bulunan biyoaktif bileşenlerden sağladığı bilinmektedir. Yapılarında bulunan terpenoidler, asetojenler, aromatik bileşikler kimyasal savunmalarında ve bariyer görevi görmede etkilidir (görülen en yaygın monoterpenoid; β-siklocitraldir). Kimyasal uyumları ile anatomik uyumları karşılaştırıldığında; kimyasal uyumları daha ağır basmaktadır. İlk defa sekonder metobolit çalışmaları, 1908'de Paul tarafından *Sphagnum* türünde antosiyanin pigmentlerinin varlığının belirlenmesiyle yapılmıştır. Bryofitlerin yaşamsal yöntemi, ortama ve ortam şartlarına bağlı olarak gösterdikleri ya da gösterebilecekleri tepkilerdir. Hayatları boyunca en önemli özellikleri eşeysiz üreme ve eşeyli üreme arasındaki denge halidir. Bu iki üreme şeklini sağlayabilmeleri için, bir üreme gücü göstermeleri gerekmektedir. Gösterilen bu üreme gücü, eşeyli üreme için yüksek,

eşeysiz üreme için düşük gerçekleşmektedir. Bu özellik popülasyona ve türlere bağlı olarak değişmektedir. Bryofitler de birey sayısından dolayı ölüm yok denilecek kadar azdır. Ölüm oranı, abiyotik (sıcaklık, nem, ışık) çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Briyofitlerin uygun olmayan yaşam şartlarına karşı verdiği tepkiler gruplandırılmıştır (Alataş ve Batan, 2016; Asakawa ve Ludwiczuk, 2013; Asakawa ve Ludwiczuk, 2019; Ezer vd. 2016; Hazer, 2017).

Bryofitler kuzey ve güney yamaçlarında, ılıman ve tropikal bölgelerin önemli iklim tiplerinde vejetasyon süresinin önemli bir bölümünü meydana getirmektedirler. Doğada taş üzerinde, kaya üzerinde, tamamen suyun içine gömülü olarak ve su içerisindeki kayaların üstünde bulunabileceği gibi, canlı ve ölü ağaçların gövde kısmında ve dallarının üzerinde, yarı saprofit olarak çürümek üzere olan organik maddeler üzerinde ve nemin oldukça az olduğu kurak yerlerde yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Çöteli vd. 2017).

1.2.2 Karayosunlarında Üreme

Eşeyli Üreme: Karayosunlarında üreme oogami ile gerçekleşmektedir. Bir ve iki eşeyli türler bulunmaktadır. İçte sperm ana hücresi, dışta koruyucu doku, anteridyumlar (mikrogametangiyum) kısa bir saptan oluşmaktadır. Anteridyumlar küçük kamçılı spermlerden meydana gelmektedir. İçinde yumurta hücresi bulunan karın ve olgunlaştıkça içi boşalan bir boyundan meydana gelen vazo şeklindeki arkegonyumlara (makrogametangiyum) sahiptir. Arkegonyum ve anteridyum monoik türlerde aynı bireyde meydana gelebilmektedir. Dişi ve erkek bireyler (gametofitler) dioik türlerde ayrıdır.

Dişi bireylerde arkegonyumlar, erkek bireylerde anteridyum meydana gelmektedir. Yaprakların oluşturduğu çanaklardan, yaprak koltuğundan ya da gövdelerin ucundan gametangiyumlar çıkar. Anteridyum, spermlerin olgunlaştığı zaman açılırlar. Anteridyumdan ayrılan spermler arkegonyuma, yeterli su varsa ulaşır. Spermleri, arkegonyumun salgıladığı, feromonlar çeker. Sperm boyun kısmından girer ve yumurta hücresi ile birleşir. Zigot oluşur, oluşan zigot gametofitten ayrılmaz. Arkegonyumun içerisinde gelişmeye devam eder. Embriyoyu oluşturur.

Bu da gelişerek seta (sap), kapsül (sporangiyum) ve ayaktan oluşan sporofiti verir. Şekerler gibi bazı besinleri, su ve mineral maddeleri, ayak absorbe eder. Arkegonyum gelişerek, gelişmekte olan embriyoyu sarar. Bu koruyucu doku, arkegonyumdan meydana gelir ve kaliptra olarak adlandırılır. İleriki dönemlerde, kaliptra, gametofitten kopar ve sporangiyumun uzunda koruyucu bir örtü olarak kalır. Kapsül ile ayak arasında olan ince kısım ise setadır.

Vejatatif Çoğalma: Karayosunlarının, ilkel türlerinde çok sık rastlanan bir durumdur. Yeni bireylerin meydana gelmesi, çürüyen kısımlardan ayrılan parçalardan olur (Yıldız ve Aktoklu, 2012).

1.2.3 Yaşam Döngüsü

Yaşam döngüsü karayosunlarında, haplo-diplont, heteromorfiktir. Protonema haploiddir. Mayoz bölünme, spor oluşumu sırasında gerçekleştiğinden, sporlar ve sporların çimlenmesi ile protonemayı oluşturur. Gametofitte haploittir. Doğrudan protonemdan tomurcuklanma ile oluşmaktadır. Mitoz bölünme ile gametangiyumlarda gametler meydana gelir. Döllenme ile oluşan zigot, embriyo ve sporofit diploiddir (Yıldız ve Aktoklu, 2012).

1.2.4 Karayosunları ve Beslenme

Genel olarak insanlar briyofitlerden besin kaynağı olarak yarar görmez, bununla ilgili bir bilgi literatür de bulunmamaktadır. Birçok araştırmacı, karayosunların, ölüme sebep olabilecek bitkiler arasında olmadığı sonucuna varmıştır. Orman ekosisteminde yaşayan bir kısım hayvan, karayosunlarını besin olarak kullanırken, bir kısmının ise karayosunlarını yemediği görülmüştür. İçlerinde *Bryopsida* türlerinin bulunduğu karayosunu yiyen hayvanlar, soğuk ortamlarda kalıcı olarak yaşarlar veya yıllık olarak bu yosunun bulunduğu ortama göçerler. Ancak, bazı ılıman hayvanların karayosunlar üzerine yoğun olarak otlanmadığı görülmüştür. Soğuk iklimlerde yaşayanlar, daha sıcak bölgelerde yaşayanların aksine, yosunları daha yoğun olarak tüketmektedir (Asakawa ve Ludwiczuk, 2013; Asakawa ve Ludwiczuk, 2019; Herbert ve Prins, 1982).

1.2.5 Karayosunlarının Kullanım Alanları

Briyofitler bilinen en eski kara bitkileri olmakla birlikte faydaları çoğu insanlar tarafından bilinmemektedir. Eczacılık ürünlerinde, bahçecilikte, evsel kullanım, inşaat, ilaç sektöründe kullanılmakla birlikte ekolojik açıdan da önemli bir yere sahiptirler. Briyofit florasının kullanımı dünya genelinde yayılarak daha fazla tanınmaktadır. Ciğer otları, yosunlar, boynuzlu ciğer otları briyofita grubunu oluşturan küçük ve düşük yetişen bitkilerdir. Ciğer otları, yatay olarak büyür, düzleşir ve yapraklara sahiptirler. Bunun yanında karayosunları, spiral şeklinde yaprak benzeri yapılara sahip dik bir sapa sahiptir. Biriyofitler gerçek gövdelere, yapraklara, köklere ve damar sistemine sahip değildirler. Yüksek oranda nemli ve sık yağış alan, gölgeli alanları kaplarlar (Saxena, 2004).

1.2.5.1 Ekolojik kullanımlar

Ciğer otları ve karayosunları çevresel koşulların iyi göstergeleri olarak görülmektedir. Bazı su yosunlarının oluşumu, sudaki kalsiyum ve besin içeriğinin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Bazı briyofitler, yalnızca dar ve spesifik bir pH aralığında büyür ve bu nedenle bunların varlığı toprak pH'ının bir göstergesi olarak kullanılabilir. Briyofitler ağaçların gövdelerini ve orman tabanını sarararak nemin korunmasında yardımcı olur. *Atrichum, Pogonatum, Trematodon, Pohlia* ve *Blasia* (Şekil 1.1), *Rhodobryum* (Şekil 1.1) gibi karayosunları trapezlere dayanıklı yapıları ve rejeneratif yetenekleri nedeniyle toprak erozyonu inhibitörleri olarak rol oynamaktadır (Saxena, 2004).

Kanada'da, Nova Scotia'nın meralarında, beyaz ladin *Polytrichum*'un en verimli şekilde çimlendiği görülmüştür. Birçok karayosunu, özellikle de *Hypnum imponenler*, çeşitli iğne yapraklı ağaç türleri için çok iyi tohumlama yatakları sağlar. Yağmurla birlikte toprağa geçen mineraller briyofitler tarafından tutulur. Bu nedenle, briyofitler topraktan hızlı bir şekilde ayrılabilecek mineralerin tutulmasında önemli bir yere sahiptir. Yosunlar, K, Ca ve Mg'mu yağışlardan dolayı kolayca biriktirebilmektedir. Bunun yanında demir biriktirilmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (Saxena, 2004).

Şekil 1.1 *Pohlia, Blasia, Rhodobryum* karayosunlarına ait görseller (URL-1, 2019; URL-2, 2019; URL-3, 2019)

1.2.5.2 Bahçe bitkileri süslemesinde kullanım alanları

Briyofitler bahçe bitkilerinde toprak katkıları, ekim için süs materyali olarak Japonya'da uzun süredir kullanım geleneği vardır. Özellikle yüksek su tutma kapasiteleri ve hava geçirgenlikleri nedeniyle dikkat çekmektedirler. Briyofitler sera bitkileri, saksı süs bitkileri ve fidelerinde, bahçe toprağında da kullanılmaktadır. Taze *Sphagnum* nemi korumaya ve yabancı otların büyümesine önlemeye yardımcı olmaktadır. Havaya dayanıklıdır ve esnekliği vardır, olduğu yeri, ideal bir büyüme ortamı haline getirir. Japonya'da karayosunları süs bitkileri olarak kullanımı çok popülerdir. *Polytrichum commune, Bartramia pomiformis* (Şekil 1.2) gibi karayosunu türleri, Japonya'da bahçelik sanatında kullanılmaktadır (Sexena, 2004).

Şekil 1.2 *Polytricum commine* ve *Bartramia pomiformis* karayosunlarına ait görseller (URL-4, 2019; URL-5, 2019)

1.2.5.3 Yakıt olarak briyofitler

Briyofitler, uzun denemeler sonuncunda, Finlandiya, İsveç, İrlanda, Batı Almanya, Polonya ve Sovyetler Birliği gibi gelişmiş ülkelerde yakıt olarak kullanılmıştır. Hidrojen, etilen, doğalgaz, metanol gibi gazların üretiminde kullanılmak için de uygundur. Bunun yanında turba yosunları, metan gazı üretimi için en uygun olanıdır. Gelecekte, ısı, metan veya elektrik üretiminde önemli bir yakıt kaynağı haline gelmesi olasıdır (Saxena, 2004).

1.2.5.4 Ev yapımı

Odunsu bitkilerin az olduğu ve briyofitlerin yaygın olduğu, dünyanın bazı bölgelerinde, bu bitkiler evlerin yapımında ve mobilyaların yapımında kullanılmaktadır. Himalayalar'daki, Karpot'ta köylüleri, geçici kulübelerinin açıklıklarını kapatmak için yine karayosunlarından yararlanmaktadır. Burada da *Sphagnum* türü, emici özelliğinden ve yalıtkan olmasından dolayı kullanılmaktadır. Hintliler, minderler ve yastıklar için kaba keten torbalara karayosunları yayarak koymakta ve çamurlu zeminlerde kullanmaktadırlar. Himalayalar'da karayosunları, yiyecekler saklanırken böceklerden korumak amacıyla kullanılmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı, briyofitler böcek ilacı ve böcek kovucuların yararlı bir kaynağı haline gelmektedir. Günümüzde *Sphagnum* ayakkabılarda ve botlarda, nemi ve kokuları emmek için kullanılmaktadır. Geçmişte, yumuşak elastik dokuları nedeniyle

böcekler ve mikroorganizmalar tarafından saldıraya uğramadıkları için karayosunları; yatak, paketleme, tıkama ve doldurma malzemesi olarak kullanılmıştır (Saxena, 2004).

1.2.5.5 Tıbbi kullanımı

Çinliler ve yerli Amerikalılar *Philonotis, Bryum, Minium* gibi çeşitli yosun türlerini, ezip bir tür macun haline getirdiler ve kümes hayvanlarına uyguladılar. Hindistan'da yağ ve balla karıştırılan karayosunu külleri; kesikler, yanıklar ve yaralar için bir çeşit merhem olarak kullanılmaktadır. *Marchantia polymorpha* ayrıca apseler için de bir çeşit ilaç olarak kullanılmıştır. Gelenksel Çin tıbbına bakıldığında; kalp damar sistemi hastalıkları, bademcik iltihabı, bronşit, timpanit, sistit hastalıklarının yanı sıra cilt hastalıkları ve yanıkların tedavisinde kırk çeşit briyofit türü kullanıldığı görülmektedir. *Rhobryum giganteum* ekstraktının hayvanlarda aort kan geçişini %30'a kadar attırdığı bilinmektedir. Birinci Dünya Savaşı sırasında, Almanlar, özellikle *Sphagnum* türünü yaraları sarmak için yoğun bir şekilde kullanılmışlardır (Şekil 1.3, Şekil 1.4). *Sphagnum*'un pedleri, pansumandan 3-4 kat daha fazla sıvı emmektedir. Bunun yanında daha ekonomik, daha soğuk, daha yumuşak ve cildi pamuktan daha az tahriş etmektedir (Saxena, 2004).

Şekil 1.3 *Sphagnum* türünden bandaj dizilirken (Altuner, 2008)

Şekil 1.4 *Sphagnum* dizilirken (Altuner, 2008)

1.2.6 Karayosunlarının Antimikrobiyal Etkisi

Bitkilerin bir çoğu, fenol veya bunların türevleri olan aromatik maddeleri sentezlemektedir. Sentezlenen bu meddeler, savunma mekanizması olarak; herbivorlara, mikroorganizmalara, böceklere karşı kullanılmaktadır (Tablo 1.1).

Mikroorganizmaları öldüren, üremesini engelleyen, sentetik veya doğal kimyasallara antimikrobiyal maddeler denilmektedir. Antimikrobiyallerin etkileri, öldürücü veya üremeyi durdurucu olabilmektedir. Sidal adı verilen maddeler, organizmaları öldüren maddelerdir. Öldürdükleri organizmanın tipini belirlemek için isimlerin önüne bir ön ek koyulmaktadır. Virüsler, bakteriler, fungusları öldüren maddeler; virisida, bakteriyosidal ve fungusidaldir. Statik maddeler ise, yalnızca organizmanın üremesini engelleyenler maddelerdir (Altuner, 2008; Geissman, 1963; Madigan ve Martinko, 2010).

Tablo 1.1 Bazı antimikrobiyal maddelerin etki spektrumları (Tekerlek, 2013)

Antimikrobiyal Maddeler	Bakteriler	Mayalar	Küfler
Nitrit	++	-	-
Sülfit	++	+	+
Formik Asit	+	++	++
Propiyonik Asit	+	++	++
Sorbik Asit	+	+++	+++
Benzoik Asit	++	+++	+++
Difenil	-	++	++
Hidroksibenzoikasit Esteri	++	+++	+++

Aromatik bileşiklerin bir kısmı, bitkilerin tadını belirler. Bir kısmı, tıpta kullanılmasını sağlar, bir kısmı ise kokularını vermeye yardımcı olur. Yüksek yapılı bitkiler, antimikrobiyal maddelerin kaynağı olarak kullanılmaktadır ve bu kullanımları oldukça yaygındır. Briyofitlerin günümüz florasında yaşamlarını sürdürebilmelerini sağlayan özelliklerinden biri, yapılarında bulunan biyolojik aktif bileşenleridir. Bu bileşikler bitkileri; mantarlardan, mikroorganizmalardan, böcek ve salyangoz gibi zararlı canlılardan korumaktadır (Altuner, 2008; Altuner vd. 2010; Basile, 1998; Saxena, 2004).

1.2.7 Bazı Karayosunu Türleri ve Çeşitli Kanserler Üzerine Yapılan Çalışmalar

Sphagnum centrale ve *S. capilifoliumun* lösemi ve meme kanseri üzerine etkisine dair yapılan çalışmada, *Sphagnum centrale* ve *S. capilifoliumun* türlerinde bulunan esansiyel yağların, ekstraksiyon yöntemiyle izole edilip ardından MCF-7 (meme) ve HL-60 (lösemi) hücrelerine karşı apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen karayosunu özütleri, farklı sürelerde ve farklı konsantrasyonlarda iki kanserli hücre hattına karşı deneme yapılmış ve elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile kıyaslanmıştır. Hücre çoğalmasının gözlemlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde elde edilen ekstraktlar MCF-7 ve HL-60 kanser hücre hatlarına aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 24, 48 ve 72 saatler boyunca gözlem yapılmıştır. Her iki karayosunundan da elde edilen özütler HL-60 hücre hattında inhibe edici etki göstermiştir. Bunun yanında aynı özütler, aynı ortam koşullarında MCF-7 hücre hattından elde edilen sonuçlarda, bu karayosunu türlerinin, tümör hücrelerini teşvik edici bileşenlere sahip olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile hücre inhibisyonu

karşılaştırıldığında çok kuvvetli olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. *Sphagnum centrale* ve *S.capilifoliumun'*dan elde edilen özütler, kanser hücre hatlarına karşı aktivite göstermelerinin yanında, hücre ölümüne neden olanların hangi tip hücre ölümüne yol açtığı da araştırılmıştır. Elde edilen özütler düşük konsantrasyonlarda genellikle apoptik hücre ölümlerine neden olduğu, yüksek konsantrasyonlarda ise genellikle nekrotik hücre ölümüne yol açtığı gözlemlenmiştir. Özellikle HL-60 hücre hattına karşı, yüksek oranda apoptik hücre ölümlerine neden olmuştur. Her iki karayosunundan elde edilen özütlerin hemen hemen tamamı yüksek konsantrasyonlarda nekrotik hücrelerin oluşmasına sebep olmaktadır (Aslan, 2014).

Aulacomnium palustre, Climacium dendroides, Dicranum polysetum, Polytrichum junipeerium, Polytricum komün, Rhytidiadelphus triqıeteus, Ptilium cristacastrensis, Pleurozium schreberi, Sfagnum tenellum, Sfagnum rubellum, Sphagnum magallanicium ve *Sphagnum fallax* türlerinin sıçan golioma hücreleri (C6), insan epidermoid karsinomu (A431), insan akciğer karsinomu (A549), fare melanom hücre çizgileri (B16-F10), insan meme adenokarsinom (MCF-7), insan kolorektal karsinomu (CaCo-2) hücre hatları üzerine etkisine bakıldığında; *Dicranum polysetum, Pleurozium schreberi,* sıçan glioma hücrelerinde yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. İnsan akciğer karsinomu, fare melanomu ve insan meme adenokarsinomu hücre hatlarında ise düşük aktivite gözlenmiştir (URL-6, 2019).

1.2.8 Tez Çalışmasında Kullanılan Karayosunu Türleri

Hypnum andoi; *Hypnaceae* ailesinden olup, yapraklarının uzunluğu 0,75 mm ile 1,75 mm arasında değişmektedir. Sivri kısa kapsül kapağı, benzer *Hypnum* türlerinden ayırt edilmesini sağlayan en önemli özelliğidir. Kapsül uzunluğu 2,5 mm ile 3 mm uzunluğundadır. Sürgünün alt tarafına doğru kuvvetli kavisli, tepe noktasına doğru yavaş yavaş sivrilen karakteristik yapraklara sahiptir (Şekil 1.5) (Alataş ve Uyar, 2015; Altuner ve Canlı, 2012; Atherton vd. 2010).

Şekil 1.5 *Hypnum andoi* (URL-7, 2019)

Syntrichia ruroliformis; Pottiaceae familyasından olmakla birlikte, 1-4 cm olan bu bitkiler, bazen kuma gömülü olarak bulunurlar. Genellikle geniş ve bazen de bölgesel olarak baskın olan belirsiz yamaları ortam nemli olduğunda sarı-yeşil ila altın-kahverengi, kum tepelerinde kuruduğunda kahverengimsi renk alır. Özellikle kalkerli ve kumlu topraklarda, kıyı kumları üzerinde çok yaygın, başka yerlerde ise nadir bulunurlar (Şekil 1.6) (Alataş ve Batan, 2015; Smith, 1978).

Şekil 1.6 *Syntrichia ruraliformis* (URL-8, 2019)

Platyhypnidium riparioides; Brachytheciaceae ailesinden olup, en belirgin karakteristik özellikleri geniş yumurta şeklinde, tabanda daralmış, sivri uçlu yapraklarıdır (1,5-2,5 mm). Uzun, tek bir sinire sahiptir, ince fakat belirgin bir şekilde

dişli kenarları vardır. Sürgün ucu, geniş ve düz görünümlüdür, diğer türlerde ise durum böyle değildir kapsül uzunluğu yaklaşık olarak 2 mm'dir (Şekil 1.7) (Atherton, vd. 2010; URL-9, 2019).

Şekil 1.7 *Platyhypnidium riparioides* (URL-10, 2019)

Karayosunlarına ait birçok çalışma olmasıyla birlikte, kanser üzerine etkileri hakkında araştırılması gereken oldukça geniş bir alan vardır. Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından aktif kimyasallar için kullanılan briyofit kayıtları tekrar gözden geçirilmiştir. 1977'de Maryland'den bir yosun özü, KB hücre kültüründe sitotoksisite göstermiştir. Fakat 1980'e kadar briyofitlerde antitümör etkisi keşfedilememiştir. Bu yüzden 1980-1981 yılları arasında briyofitlerin toplanması, taranması ve üzerine çalışmalar yapılması daha da artmıştır (Spjut, ve Suffness, 1986).

Yapılan bir çalışmada 43 türün aktif olduğu, 75 türün fareler için toksik olduğu antitümör ajanlar için birçok türün bulunduğu bir briyofit taraması yapılmıştır. Yapılan çalışmada, bu projede yer alan türlere ait familyalardan da briyofit örnekleri bulunmaktadır. *Brachytheciaceae, Hypnaceae* familyalarının en fazla aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. En eski kara bitkileri olarak kabul edilen briyofitler, farklı stres türlerine karşı mücadele etmek için bir dizi ikincil metabolit sentezlerler. Bu fitokimyasalların varlığından dolayı enfeksiyon, yıpranma, radyasyon, sıcaklık, tuzluluk dalgalanmaları ile başa çıkabilirler (Dey ve Mukherjee, 2015).

Yapılan literatür taramasında seçilen karayosunu türlerinin ait olduğu familyalarda antioksidan ve antikanser çalışmalarının bulunmasıyla birlikte, bu çalışmalar yeterli

bulunmamıştır. Yukarıda belirtilen karayosunu türlerine ait antioksidan çalışması ve kolorektal kanser hücre hattı HCT116 üzerine antikanser çalışmaya dair bir bulguya rastlanmamıştır. Tüm bunlar göz önüne alındığında HCT116 hücre dizisinde çeşitli dozlarda karayosunu ekstreleri denenerek antikanser etkileri değerlendirilecektir. HCT116 farklılaşma kapasitesi çok az olan veya hiç olmayan agresif hücre dizisidir. HCT116 hücreleri farklılaşmaz, lümen oluşturan kolonilere yol açmaz. Yapılan çalışmalarda HCT116 hücrelerinin kendi kendini yenileyebilen ve çoklu soylara farklılaşabilen hücre yüzey işaretleyicileri ve koloni morfolojisi ile karakterize edilen kanser kök hücrelerinin alt popülasyonlarını içerdiği belirlenmiştir (Yeung ve Gandhi, 2010).

2. YÖNTEM

Yapılan bu tez çalışmasında literatür taramasında kolorektal kanser üzerine etkileri bulunmayan üç farklı karayosunu türü ile çalışılmıştır. Bu karayosunları; *Syntrichia ruraliformis*, *Hypnum andoi* ve *Plathypnidium riparioides*'dir. Kullanılan karayosunu türleri Doç. Dr. Kerem CANLI'nın kişisel koleksiyonundan, Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER aracılığıyla temin edilmiştir. Bu koleksiyon Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyoloji bölümü Herbaryumunda yer almaktadır. Kişisel koleksiyon örneklerinin daha önce toplanmış olduğu lokasyon bilgileri şu şekildedir:

- *Syntrichia ruraliformis* (Amasya Akdağ)
- *Hypnum andoi* (Amasya Akdağ)
- *Plathypnidium riparioides* (Amasya Akdağ)

Karayosunu türlerinde bulunan farklı etken maddelerini keşfedebilmek için çözücü olarak %99,9 saflıkta etil alkol kullanılmıştır. Etil alkole ait relatif polarite ve kaynama noktası değerleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Etil alkole ait relatif polarite ve kaynama noktası değerleri

ETİL ALKOL	
RELATİF POLARİTE	**0,654**
KAYNAMA NOKTASI	**78,37^{0}C**

2.1 Etil Alkol Ekstraktının Hazırlanması

Syntrichia ruraliformis Ekstraksiyonu: Kastamonu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, 0,5 gr karayosunu hassas terazide tartılarak, havanda toz haline getirilmiştir (Şekil 2.1). Havanelleri kullanılmadan önce %70'lik etil alkol ile temizlenip iyice kurutulmuştur. Toz haline getirilen karayosunları tekrar tartılarak 0,5 gr oluncaya kadar toz haline getirilmeye devam edilmiştir. Örnekler tartılarak erlene alınıp üzerine, karayosunu örneğinin etil alkolü çekmesine göre %99,9 saflıkta etanol eklenmiştir. Toplam 60 ml etanol, toz haline getirilen karayosunu üzerine eklenmiştir. Erlenin ağzı parafilm ile kapatılarak etiketlemesi yapılıp 130 rpm'de orbital çalkalayıcının (WiseShake, Kore) üzerine koyularak, bir hafta süreyle oda sıcaklığında çalkalanmaya bırakılmıştır. (Şekil 2.2).

Hypnum andoi Ekstraksiyonu: 0,5 gr karayosunu hassas terazide tartılarak, havanda toz haline getirilmiştir (Şekil 2.1). Toz haline getirilen karayosunları tekrar tartılarak 0,5 gr oluncaya kadar toz haline getirilmeye devam edilmiştir. Tartılan örnekler erlene alınarak üzerine, karayosunu örneğinin etil alkolü çekmesine göre %99,9 saflıkta etanol eklenmiştir. Toplam 60 ml etanol, toz haline getirilen karayosunu üzerine eklenmiştir. Erlenin ağzı parafilm ile kapatılarak etiketlemesi yapılıp 130 rpm'de orbital çalkalayıcının (WiseShake, Kore) üzerine koyularak, bir hafta süreyle oda sıcaklığında çalkalanmaya bırakılmıştır (Şekil 2.2).

Plathypnidium riparioides Ekstraksiyonu: 0,5 gr karayosunu hassas terazide tartılarak, havanda toz haline getirilmiştir (Şekil 2.1). Toz haline getirilen karayosunları tekrar tartılarak 0,5 gr oluncaya kadar toz haline getirilmeye devam edilmiştir. Tartılan örnekler erlene alınarak üzerine, karayosunu örneğinin etil alkolü çekmesine göre %99,9 saflıkta etanol eklenmiştir. Toplam 50 ml etanol, toz haline getirilen karayosunu üzerine eklenmiştir. Erlenin ağzı parafilm ile kapatılarak etiketlemesi yapılıp 130 rpm'de orbital çalkalıyıcının (WiseShake, Kore) üzerine

koyularak, bir hafta süreyle oda sıcaklığında çalkalanmaya bırakılmıştır (Şekil 2.2). Karayosunlarının üzerine eklenen etil alkol miktarları Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2 Toz haline getirilen karayosunlarının üzerine eklenen etil alkol miktarları

Karayosunu çeşitleri	**Eklenen Etil Alkol Miktarı (ml)**
***Syntrichia ruraliformis* (K1)**	**60 ml**
***Hypnum andoi* (K2)**	**60 ml**
***Plathypnidium riparioides* (K3)**	**50 ml**

Şekil 2.1 Karayosunlarının havanda toz haline getirilmesi

Şekil 2.2 Karayosunlarının orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilmesi

2.2 Hazırlanan Ekstraktan Çözücünün Uzaklaştırılması

Bir haftanın sonunda öncelikle boş bir balonun darası alınmıştır. Ekstraktlar çalkalayıcıdan alınarak Whatman No:1 filtre kağıdından süzülüp, darası alınan balonun içine koyulmuştur. Filtre kağıdında kalan toz kısım atılarak işleme süzülen kısımdan devam edilmiştir (Şekil 2.3).

Süzme işleminden sonra etil alkol ekstraktları döner buharlaştırıcıda (Heidolph) vakum altında 130-150 rpm'de ve 40-45°C sıcaklıkta çözücü maddenin uzaklaştırılması sağlanmıştır (Şekil 2.4). Bu işlem sırasında bileşiklerin zarar görmemesi için kaynama sıcaklığı 45-50°C'den yukarıya çıkarılmamış, evaporatör cihazında çözücü maddenin ne kadar zaman diliminde buharlaştığı takip edilerek yaklaşık 15-20 dakika arası bir zaman diliminde çözücünün tamamen buharlaştığı gözlemlenmiştir. Verim hesabı yapabilmek için balon ağırlığı buharlaştırma işleminden sonra tekrar tartılmıştır. Çözücünün buharlaştığı balon içerisinde kalan karayosunu örneği ince uçlu bir spatül ile kazanılarak ağırlığı ölçülmüş ependorf bir tüp içine alınmıştır. Örnek koyulduktan sonra ependof tüpün ağırlığı tekrar ölçülerek

içerisinde en az 5 mg örnek olacak şekilde tartım yapılmıştır. Bu işlemler sırasıyla bütün karayosunu ektraksiyonlarına uygulanmıştır. Ependorf tüpe alınan örnekler oda sıcaklığında karanlık bir ortamda tutulmuştur.

Şekil 2.3 Etil alkol ekstraksiyonunun Whatman no:1 filtre kağıdında süzülmesi

Şekil 2.4 Etil alkolün evaporasyon yöntemi ile uzaklaştırılması işlemi

2.3 Çözücünün Uzaklaştığı Ekstrakların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Doku Kültürü Laboratuvarında çözücüsü buharlaştırılarak ependorf tüpe alınan örnekler, 5 mg olacak şekilde ayarlanarak, 5 mg/ml DMSO'da stok çözeltileri hazırlanmıştır.

2.4 Kolorektal Kanser Hücre Kültürünün Hazırlanması

2.4.1 Vasat Hazırlanması

13,4 gr high glukoz DMEM ile 3,7 gr sodyum bikarbonat tartılarak 1 lt steril saf su içerisinde çözündürülmüştür. 0,45 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek hazırlanan stok medyum +4°C'de saklanarak kullanılacağı zaman %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiştir.

2.4.2 Kolorektal Karsinoma Hücre Serisinin Hazırlanması

Yapılan tez çalışmasında insan kolorektal karsinoma (ATCC) hücre hatları olan HCT116 kullanılmıştır. Hücre hatları İstanbul Ünversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümü, Prof. Dr. D. Serap KURUCA'nın laboratuvarından temin edilmiştir. İlk olarak dondurulmuş hücre hatlarına, hücre çözme işlemi uygulanmıştır. Çözülen hücreler T75 kültür kapları içerisine alınarak üzerine %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM koyulmuştur. Kültür kapları 37°C, %5 CO_2 içeren inkübatöre hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için kaldırılmıştır. Hücreler %80 doluluğa ulaştığında (Şekil 2.5) Tripsin-EDTA ile pasaj yapılarak alt kültür işlemi uygulanmıştır. DMEM, FBS ve penisilin-streptomisin ile resüspanse edilmiş ve bu şekilde deney boyunca kullanılacak olan hücre serileri hazırlanmıştır. Bütün kanser hücresi denemeleri Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi bünyesinde yer alan Doku Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Şekil 2.5 %80 doluluğa ulaşan HCT116 hücreleri

2.4.3 Karayosunu Ekstrelerinin Stok Çözeltilerinin ve Farklı Konsantrasyonlarda Doz Hazırlanması

Etil alkol ekstrelerinin, DMSO (5 mg/ml)'da stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltiler istenilen konsantrasyonda medyum ile seyreltilerek doz ayarlaması yapılmıştır. K1, K2, K3 karayosunu türleri için aynı dozlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dozlar; 100, 90, 80, 70, 60, 50 µg/ml olarak belirlenmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3 K1, K2, K3 karayosunu türlerine uygulanan doz konsantrasyonları

Karayosunu Türleri	Belirlenen Konsantrasyon (µg/ml)
K1, K2, K3	**100/ 90/ 80/ 70/ 60/ 50**

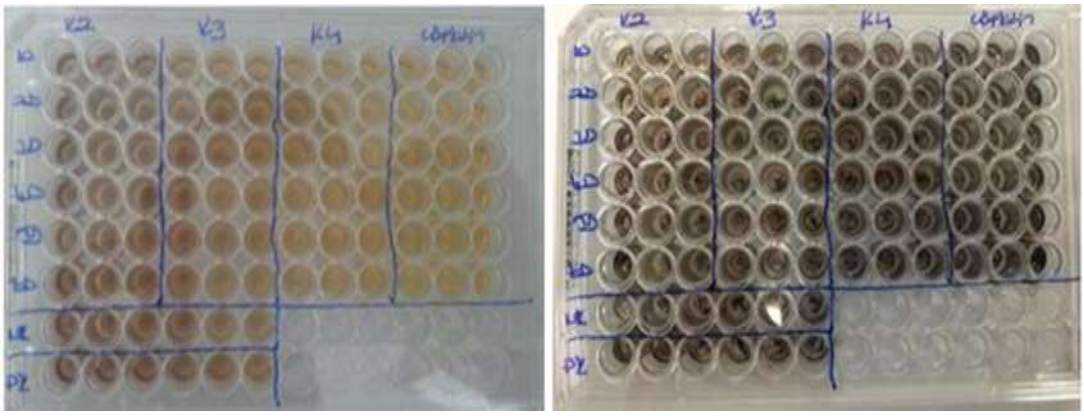
2.4.4 MTT Analizi

Canlı hücreler tarafından substratın kromojenik ürüne dönüştürülmesine bağlı olan canlılık testleri arasında, MTT testi hala en popüler olanlar arasındadır. Sarı renkte olan MTT 3-[4,5-dimetil tiyazol-2-yl]-2,5 difeniltetrazom bromid, metabolik olarak canlı hücrelerde dehidrogenaz enzimi aktivetisiyle indirgenerek mor renkli formazan oluşturur. Formazan daha sonra çözündürülür ve konsantrasyon 570 nm'de optik yoğunluk ile belirlenir. Kuyucuk başına yaklaşık 106 hücreye kadar çok iyi bir doğrusallığa sahip hassas bir testtir. Metabolik aktivitedeki küçük değişiklikler, MTT'de büyük değişiklikler oluşturarak kişinin doğrudan hücre ölümü olmadan toksik bir ajana maruz kalmasıyla hücre stresini tespit etmesine izin verir. Test, çok sayıda kuyucukta bulunan yapışkan veya yapışkan olmayan hücreler için standardize edilmiştir (Kumar ve Nagarajan, 2018).

Çözücü olarak %99,9 saflıkta etil alkolde hazırlanan *Syntrichia ruraliformis, Hypnum andoi* ve *Platyhypnidium riparioides* karayosunu ekstreleri farklı konsantrasyonlarda 3 gün boyunca hücrelere uygulanması sonucunda hücrelerde meydana gelen sitotoksik etki, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. MTT analizini yapabilmek için öncelikle hücre sayımı yapılmış ve işlem için tripan mavisi kullanılmıştır. Tripan mavisi cansız hücreler tarafından absorbe edilirken, canlı hücrelerin membran yapısı zarar görmediği için içine giremez. Mikroskop altında canlı hücreler renksiz, cansız hücreler ise boyalı gözükmektedir. Hücre sayımında öncelikle %80 doluluğa ulaşan hücrelere, tripsinizasyon işlemi uygulanarak santrifüj işleminin ardından pellet 1 ml besiyeri içerisinde (%10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin, DMEM) çözündürülmüştür. Hücre süspansiyonundan 10 µl bir ependorf tüp içerisine alınarak üzerine 990 µl (%10) tripan mavisi solüsyonu koyulmuştur. Süspansiyondan 10 µl alınıp Thoma Lamının üzerine koyularak mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı yapılırken canlı ve cansız tüm hücreler sayılmıştır. Canlı hücrelerin yüzdesi hesaplanırken formül 2.1'deki denklem kullanılmıştır:

$$\%Canlı\ hücre = \frac{\sum Boyanmamış\ Hücre\ Sayısı}{\sum\ Hücre} x100 \qquad 2.1$$

Hücre sayımının ardından her kuyucuk için 1000 hücre olacak şekilde 96'lık kuyucuklar içerisine hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından hazırlanan karayosunu ekstrelerine ait dozlardan 10 µl alınarak kuyucuklara uygulanmış ve her karayosunu türü için 3 tekrar yapılmıştır. İşlemi tamamlandıktan sonra içerisinde HCT116 hücrelerinin ve bu hücrelere uygulanmış karayosunlarına ait dozlar bulunan 96'lı plaka 37ºC, %5 CO_2 içeren inkübatörde 72 saat bekletilmiştir. Süre sonunda 96'lı plaka içerisindeki her kuyucuğa 10 µl MTT reaktifi koyularak (Şekil 2.6) 4 saat 37ºC, %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilmiş ve süre sonunda (Şekil 2.6) isopropil alkol ile oluşan formazan çözülerek ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda, 96'lı plakadaki kuyucukların absorbansları ölçülmüştür. MTT analizlerinin sonucunda doz/cevap eğrileri hazırlanarak, bileşiklerin IC_{50} değeri (hücrelerin %50'sinin büyümesini inhibe eden konsantrasyon) hesaplanıp bu parametreye göre ekstraktın etkinlikleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.6 MTT reaktifi eklendikten sonra, inkübasyon öncesi ve sonrasına ait görüntüler

2.5 Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Hazırlanması

Kemik iliği stroması içinde mezenkimal kök ya da mezenkimal progenitör hücreler olarak adlandırılan hematopoeietik olmayan hücrelerin bir alt kümesi bulunur. Mezenkimal kök hücreler kendi kendini yenileme ve birden çok dokuya farklılaşma potansiyeline sahiptir. Bu hücreler *ex vivo* olarak büyütülebilir ve *in vitro* veya *in vivo* olarak osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere, tenositlere, miyotüplere, nöral hücrelere farklılaşması için indüklenebilir. Kolay izolasyonu ve kültürü, yüksek *ex vivo* yayılma potansiyelleri bu hücreleri çekici bir terapötik araç haline getirir (Bonab ve Alimoghaddam, 2006; Minguell ve Erices, 2001).

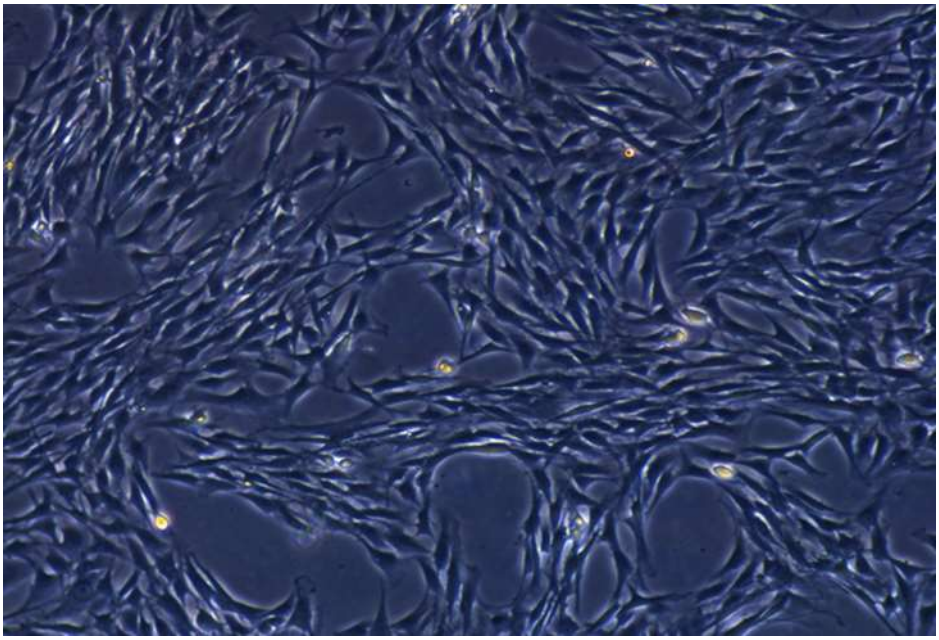
Mezenkimal kök hücreler Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MERLAB) bünyesinde bulunan Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN'in sorumluluğundaki, Doku Mühendisliği Biyomalzeme ve Kök Hücre Laboratuvarı kapsamındaki hücre kütüphanesinden temin edilmiştir. Kullanılan hücreler bu laboratuvar bünyesinde KÜ-HADYEK 2018-10 Etik Kurul İzni ile hazırlanan MKH hattının P6 aşamasındaki hücreler olup, Kastamonu Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 25.03.2021 tarihli 2 sayılı toplantısının 12 sayılı kararı ile kullanılması için etik kurul onayı gerekmediği ayrıca onaylanmıştır.

2.5.1 Mezenkimal Kök Hücre Vasatının Hazırlanışı ve Hücrelerin Büyütülmesi

10,1 gr α-MEM (Minimum Essential Medium-alpha) ile 2,2 gr sodyum bikarbonat tartılarak 1 lt steril saf su içerisinde çözündürülerek 0,45 µm çapındaki steril filtreden geçirilmiştir. Hazırlanan stok vasat +4°C 'de saklanmış ve kullanılacağı zaman %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiştir. İçerisinde %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin bulunan α-MEM besiyeri kültür kaplarına koyularak tüm zemin ıslatılmış ardından mezenkimal kök hücreler kültür kaplarına koyularak 37°C, %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda kültür kapları içerisindeki tüm vasat çekilip içerisine yeni besiyeri koyularak hücre kültürüne alma işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.5.2 Karayosunu Türlerinin Mezenkimal Kök Hücrelerine Uygulanması

%80 doluluğa ulaşan mezenkimal kök hücrelere (MKH) (Şekil 2.7) tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Hücre sayımı yapılarak her kuyucuk için 1000 hücre olacak şekilde 96'lık kuyucuklara hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.7 %80 doluluğa ulaşan mezenkimal kök hücreler

Toplam hacim 250 µl olacak şekilde, kuyucuklara %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren α-MEM eklenmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışması için bir gece 37ºC, %5 CO_2 ve %90 nem içeren inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuktan 25 µl vasat çekilerek, kuyucuklara hazırlanan karayosunu ekstraktlarına ait dozlardan 25 µl eklenmiştir. Kök hücrelere uygulanacak olan dozlar, stok çözeltiler kullanılarak, α-MEM ile aynı oranda tekrar hazırlanmıştır. Her karayosunu türü için iki tekrar yapılmıştır. Hücreler inkübatöre kaldırılarak 72 saat bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı kısım tamamen çekilerek 225 µl, penisilin-streptomisin içeren α-MEM eklenmiştir. Üzerine 25 µl MTT reaktifi eklenerek 4 saat 37ºC, %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı tamamen çekilerek atılmış ve kuyucuklara 250 µl isopropil alkol koyularak oluşan formazan çözülmüştür. Steril haldeki farklı bir 96'lık plaka içerisine kontrol, örnek ve kör çözeltilerinden 200 µl koyularak multimode mikroplaka (SYNERGY-HTX multi-mode reader) okuyucuda 570 nm dalga boyunda, kuyucukların absorbansları ölçülmüştür.

2.5.3 FT-IR Analizi İçin Numune Hazırlanması

HCT116 hücreleri 6'lı kuyucuklara ekilerek hücreler %80 doluluğa geldiğinde, vasat değişimi yapılarak, üzerine karayosunu ekstraklarından önceden belirlenen IC_{50}

konsantrasyonları eklenmiştir. 37ºC, %5 CO_2 içeren inkübatörde 72 saat bekletilerek, 72 saat sonunda inkübe edilen hücreler 3 kez PBS ile santrifüjlenerek süpernatant kısım atılıp, pellet kısmı 1 ml DMEM ile çözdürülmüştür. Her bir karayosunu için ayrı lamlar etiketlenerek hücre süspansiyonu lamlar üzerine yayılarak, lamların kuruması için 24-48 saat çeker ocakta bekletilmiştir. Kuruyan lamlar üzerindeki örnekler kazılarak ependof tüpler içerisine alınmıştır. Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan ATR-FTIR (BRUKER Alpha) cihazı ile analizleri yapılmıştır. ATR-FTIR spektrumları oda sıcaklığında 4000 ile 450 cm^{-1} arasındaki spektral bölgede elde edilmiştir. Bireysel hücresel bileşenlerdeki niceliksel değişikliklerin analizi için, tek tek bileşenler için belirli bantlar için soğurma yoğunluğunun oranları belirlenmiştir. Spektral normalizasyon baseline düzeltmesi sonrası uygun spektral aralıktaki eşit alan açısından (lipitler için 3300-2800 cm^{-1}, proteinler için 1800-1200 cm^{-1}, nükleik asitler için 1200-900 cm^{-1}) değerlendirilmiştir.

2.5.4 İstatiksel Analiz

Sitotoksisite indeksi kontrole kıyasla 2.2'deki formülle hesaplanmıştır.

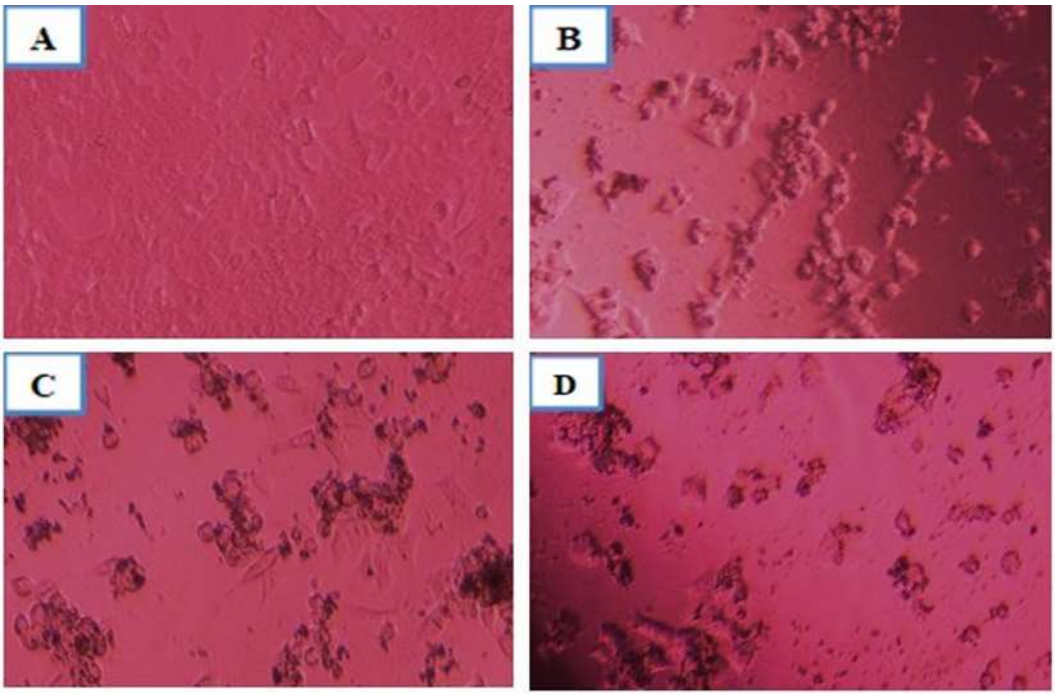
$$\%\ Sitotoksisite\ İndeksi = \frac{\sum Karayosunu\ ektreleri\ ile\ muamele\ edilmiş\ kuyucuklar}{\sum Kontrol\ grubu\ kuyucukları} X100 \qquad 2.2$$

Deneylerin sonuçları tek yönlü ANOVA tarafından Graphpad Prism 9.1.0 programı kullanılarak çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Kontrol grubu ortalamasına karşı diğer grupların ortalamalarının karşılaştırılması Dunnett testi ile gerçekleştirilmiştir. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Morfolojik Bulgular

HCT116 kontrol grubu koloni halinde yüzeye yayılmış olarak gözlenmiştir (A). Karayosunu uygulamaları sonucunda hücrelerin hacimlerinde bir artış tespit edilerek, hücrelerin bazılarında iğsi şekil artışı saptanmıştır (B-C). Bazı hücrelerde ise morfolojik olarak büzülme ve yuvarlak hücre görüntüleri oluşmuştur (D). Ayrıca hücreler arası bağlantıların azalarak kolonileşmelerin de azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.1).

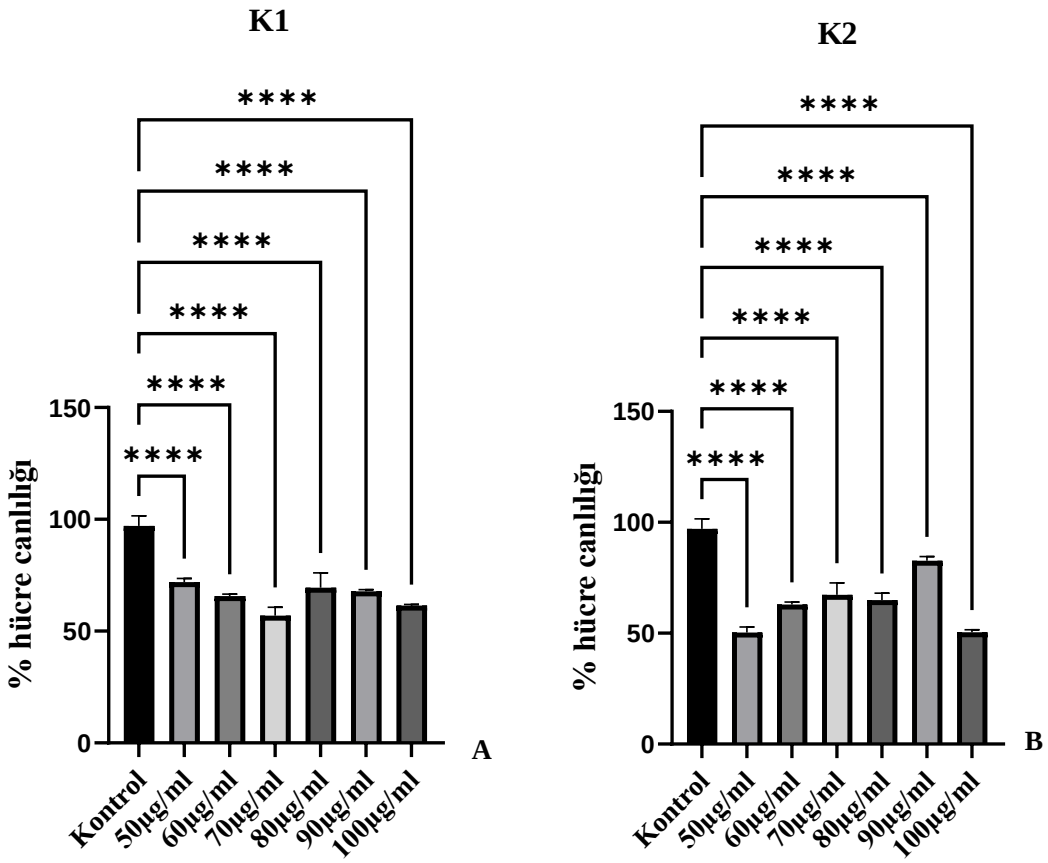


Şekil 3.1 Karayosunu türleri uygulanmış HCT116 kanser hücrelerinin morfolojik görüntüleri büyütme X100

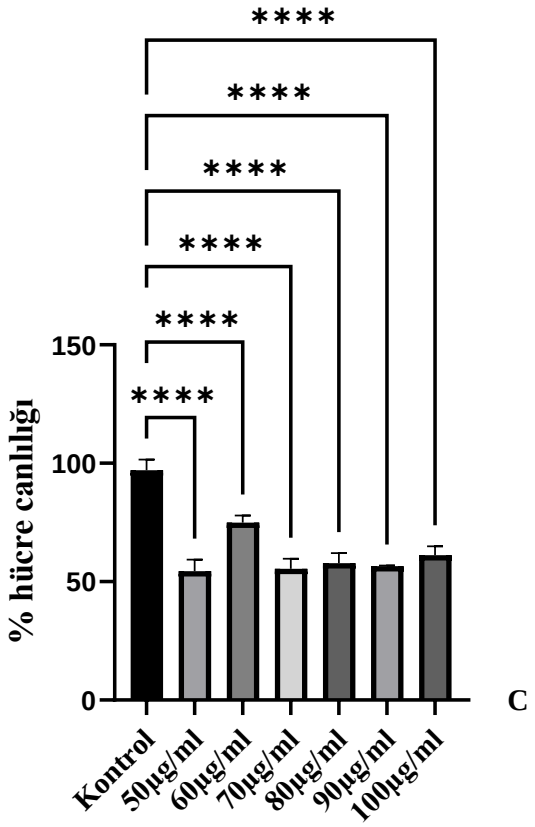
3.2 Hücre Canlılığı Bulguları

Yapılan tez çalışmasında kolorektal kanser hücresi olan HCT116 hücre serisi kullanılmıştır. Kullanılan karayosunu türlerinin dozları 100, 90, 80, 70, 60, 50 µg/ml aralığında seçilerek, hücre proliferasyonuna etkileri MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. Kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilmiştir. HCT116 hücreleri ile kontrol grubu (HCT116) karşılaştırılmıştır. Tüm karayosunu gruplarında

uygulanan konsantrasyonlardan hangisinin hücre canlılığını %50 inhibe ettiği belirlenmiştir. Belirlenen dozlara ait % canlılık grafiği GraphPad Prism 9.1.0 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Etil alkol ile hazırlanmış K1, K2, K3 karayosunu ekstraktının kontrol grubuna kıyasla, uygulanan tüm konsantrasyonlarda HCT116 hücreleri üzerinde, canlılığı azaltıcı yönde etki ettiği görülmüştür. Özellikle K1'de 70 µg/ml, K2'de 50 µg/ml ve K3'de 50 µg/ml konsantrasyonlarda en iyi sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.2).



K3

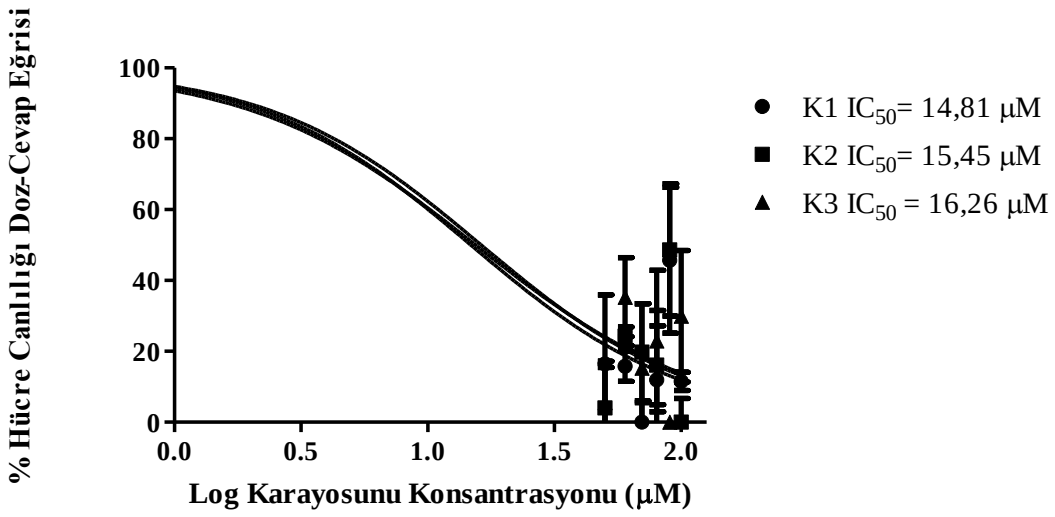


Şekil 3.2 72. Saat sonunda hücre canlılığı (%) MTT testi ile belirlenmiştir. K1, K2 ve K3 ekstraksiyonu doza bağlı bir şekilde kolorektal kanser hücre dizisi HCT116'da belirgin hücre ölümünü indüklemiştir. Veriler, her koşul için üç bağımsız deneyden alınmıştır. Kontrol grubuna göre uygulanan karayosunu dozları istatiksel olarak değerlendirilmiştir (a-c) (**** p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05)

Tablo 3.1 Kontrol grubu ile K1, K2 ve K3 karayosunu gruplarının ortalamalarının karşılaştırılması (sonuçlar ortalama ± SEM olarak verilmiştir)

	K1	K2	K3
Kontrol	**97,1 ± 1,834**	**97,1 ± 1,834**	**97,1 ± 1,834**
50 µg/ml	**71,96 ± 0,6773******	**50,28 ± 1,045******	**54,44 ± 1,974******
60 µg/ml	**65,73 ± 0,329******	**62,96 ± 0,4451******	**74,95 ± 1,2******
70 µg/ml	**56,99 ± 1, 529******	**67,29 ± 2,187******	**55,43 ± 1,761******
80 µg/ml	**69,41 ± 2,709******	**64,99 ± 1,238******	**57,77 ± 1,761******
90 µg/ml	**67,76 ± 0,3483******	**82,73 ± 0,7354******	**56,56 ± 0,09676******
100 µg/ml	**61,45 ± 0, 1935******	**50,45 ± 0,4644******	**61,14 ± 1,529******

K1, K2, K3 karayosunu türlerine ait IC_{50} değerleri Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Etil alkol çözücüsüyle hazırlanmış olan K1, K2, K3 karayosunlarının HCT116 hücre canlılığı

Yapılan tez çalışmasında kontrol grubu olarak özellikle kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan sisplatin kemoterapi ilacı kullanılmıştır. Sisplatin oda sıcaklığında beyaz veya koyu sarı ile sarı-turuncu şeffaf toz halindedir. İyi bilinen kemoterapötik bir ilaçtır. Suda az, dimetilformamid ve N,N-dimetilformamid içinde çözünür. Normal sıcaklıklar ve basınçlar altında stabildir. Ancak zamanla yavaş yavaş trans-izomere dönüşebilir. Mesane, baş, boyun, akciğer dahil çok sayıda insan kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. Yumurtalık ve testis kanserleri, germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomlar dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerine karşı etkilidir (Dasari, Tchounwou, 2014).

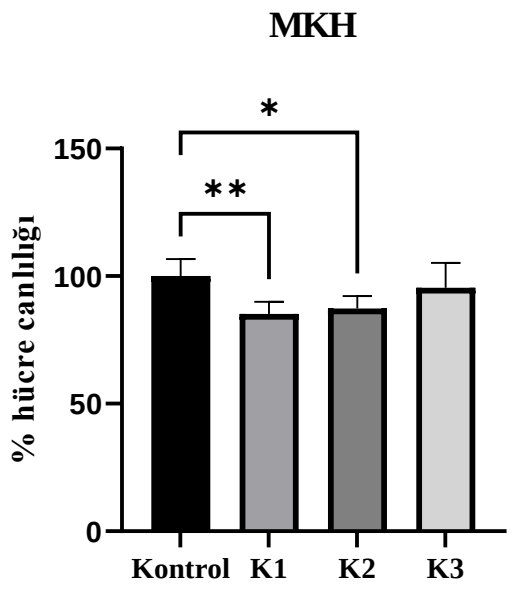
Bir maddenin sitotoksisitesi değerlendirilirken IC_{50} değeri önemlidir. IC_{50} değeri 1'e ne kadar yakınsa madde o kadar sitotoksik demektir. Elde edilen verilere göre, IC_{50} değerlerine bakıldığında tüm karayosunu türleri sisplatinden daha sitotoksiktir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 K1, K2, K3 karayosunu türleri ve sisplatin adlı kemoterapi ilacına ait IC_{50} değerleri

IC_{50} µM	
K1	**14,81**
K2	**15,45**
K3	**16,26**
Sisplatin	**18,90**

3.3 Mezenkimal Kök Hücre Bulguları

Kolorektal kanser hücre serilerinde bulunan IC_{50} değerlerine göre belirlenen dozlar aynı şekilde mezenkimal kök hücrelere de uygulanmıştır. Buna göre hücre canlılığına etkileri Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Uygulanan dozların sitotoksisite göstermesi için hücrelerin en az %30'una etki etmesi gerekmektedir. Şekil 3.4 incelendiğinde, tüm karayosunlarının mezenkimal kök hücre canlılığı üzerinde çok önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında özellikle K3 karayosunu türünde 70 µg/ml konsantrasyonda en iyi sonuç elde edilmiştir.



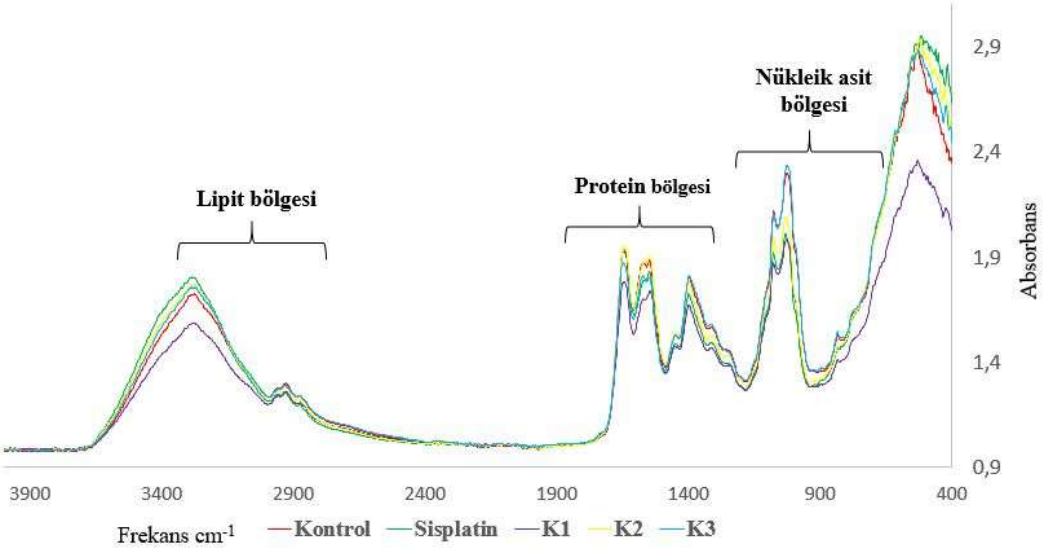
Şekil 3.4 K1, K2 ve K3 türlerinde en etkili IC_{50} dozları belirlendikten sonra mezenkimal kök hücrelerine uygulanmış ve 72. Saatin sonundaki canlılık oranları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. (**** p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05)

Tablo 3.3 Mezenkimal kök hücrelere ait kontrol grubu ile K1, K2 ve K3 karayosunu gruplarının ortalamalarının karşılaştırılması (sonuçlar ortalama ± SEM olarak verilmiştir)

	KONTROL	K1	K2	K3
MKH	**100 ± 2,738**	**85,25 ± 1,934****	**87,29 ± 1,979***	**95,48 ± 3,982**

3.4 FT-IR Bulguları

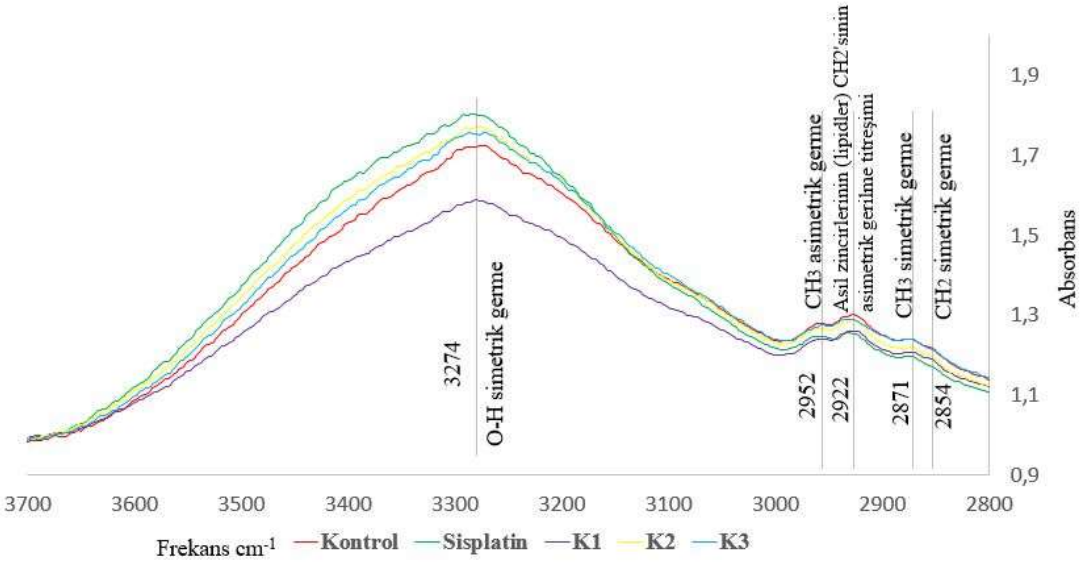
Tüm ATR-FTIR spektrumları oda sıcaklığında 4000 ile 450 cm^{-1} arasındaki spektral bölgede elde edilmiştir. Bireysel hücresel bileşenlerdeki niceliksel değişiklikleri analiz etmek için, tek tek bileşenlerin belirli bantlar için soğurma yoğunluğunun oranları belirlenmiştir. Spektral normalizasyon, baseline düzeltmesi sonrası uygun spektral aralıktaki eşit alan açısından (lipidler için 3300-2800 cm^{-1}, proteinler için 1800-1200 cm^{-1}, nükleik asitler için 1200-900 cm^{-1}) gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerleri, titreşim tipine atanan ilgili dalga numaralarında okunmuştur (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Kontrol K1-K3 karayosunu ekstraktları ve sisplatin uygulanmış HCT116 hücrelerinden elde edilen FTIR grafikleri

3.4.1 Lipit Bölgesi Sonuçları

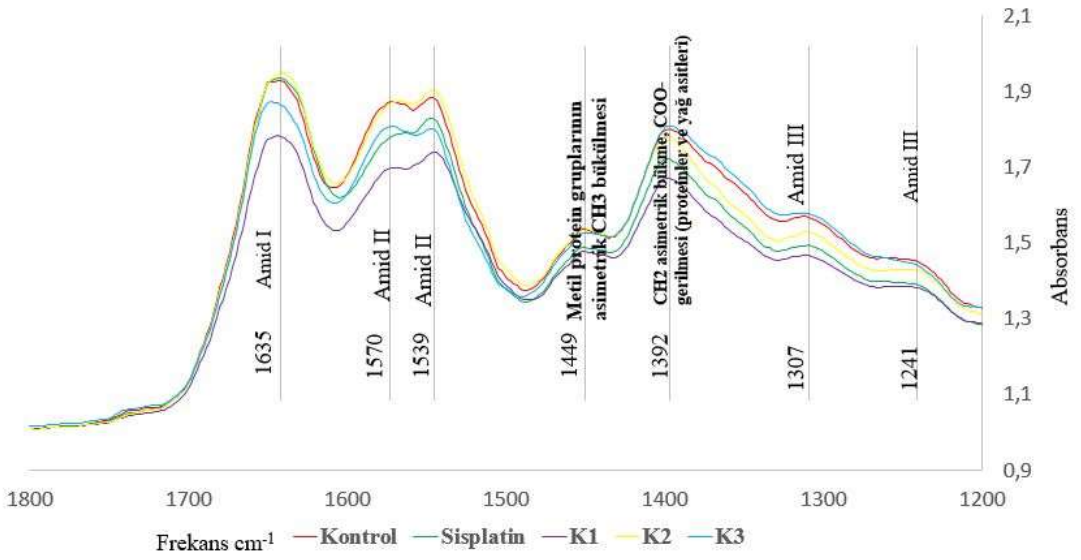
3274 cm^{-1}'de tespit edilen O-H simetrik germe bandı piki için K1 türü, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. K2 ve K3 türleri uygulanmış HCT116 hücrelerinde bu pik kontrol grubundan daha yüksek gözlenmiştir. Bunun haricinde 2952 cm^{-1}'de CH_2 asimetrik germe piki, 2922 cm^{-1}'de asil zincirlerinin CH_2'sinin asimetrik gerilme titreşim pik değerlerinde kontrol grubuna göre diğer gruplarda genel olarak bir azalma görülmüştür. 2871 cm^{-1}'de CH_3 simetrik germe piki ve 2854 cm^{-1}'de CH_2 simetrik piki tespit edilmiştir. Bu piklerde kontrol ve K3 karayosunu türünde benzer pikler görülürken diğer gruplada ise daha düşük pik değerleri görülmektedir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 3300-2800 cm^{-1} aralığı ayarlanmış lipit bölgesi karayosunu gruplarının HCT116 hücrelerine uygulanması sonucu görülen FTIR pik değerleri ve anlamları

3.4.2 Protein Bölgesi Sonuçları

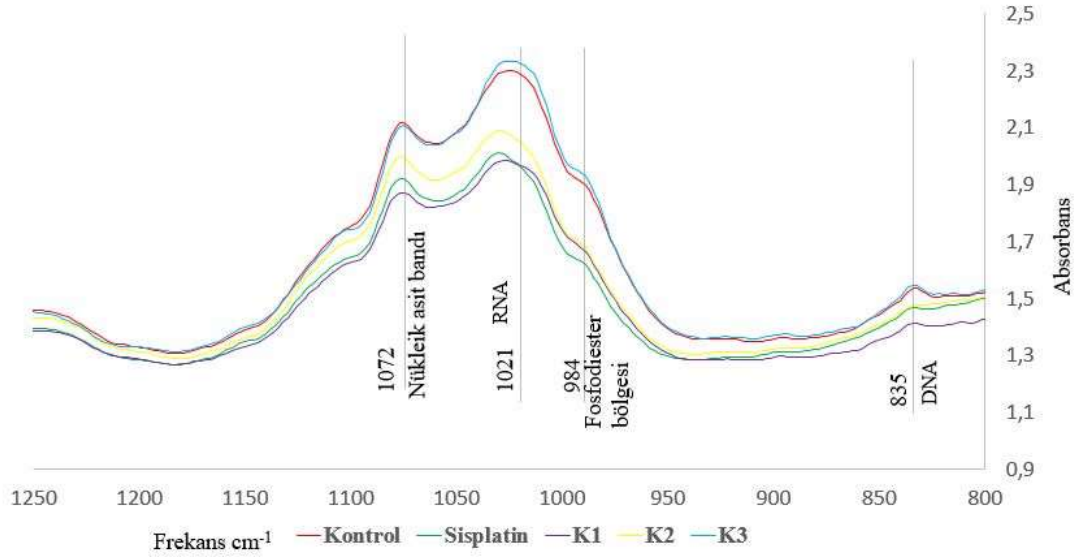
Tüm gruplarda 1635 cm^{-1}'de Amid I, 1570 ve 1539 cm^{-1}'de Amid II, 1449 cm^{-1}'de metil protein gruplarının asimetrik CH_3 bükülmesi, 1392 cm^{-1}'de CH_2 asimetrik bükme, COO- gerilmesi (proteinler ve yağ asitleri) ve 1307 cm^{-1}'de Amid III pikleri tespit edilmiştir. Amid I ve Amid II piklerinde K2 türü haricinde tüm piklerde belirgin azalma mevcuttur. Amid I pikinde K3 grubunda yaklaşık 5 cm^{-1}'lik sola kayma söz konusudur. 1449 cm^{-1} pikinde, kontrol, K2 ve sisplatin grupları benzer pikler gösterirken, K1 ve K3 türlerinde gözle görülür derecede piklerde azalma mevcuttur. 1392 cm^{-1}, 1307 cm^{-1} ve 1241 cm^{-1} Amid III piklerinde ise kontrol ve K3 gruplarında benzer pikler saptanırken, diğer gruplarda pik yoğunluklarında belirgin azalma mevcuttur (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 1800-1200 cm^{-1} aralığı ayarlanmış protein bölgesi karayosunu türlerinin HCT116 hücrelerine uygulanması sonucu görülen FTIR pik değerleri ve anlamları

3.4.3 Nükleik Asit Bölgesi Sonuçları

Şekil 3.8'de 1072 cm^{-1}'de nükleik asit bandında, 1021 cm^{-1}'de RNA piki, 984 cm^{-1}'de fosfodiester bölgesinde ve 835 cm^{-1}'de DNA bölgesinde pikler belirlenmiştir. Tüm pik yoğunlukları incelendiğinde bu bantların hepsinde kontrol ve K3 karayosunu türünde benzer oranlar saptanırken; diğer tüm gruplarda bu oran bariz azalmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 1200-900 cm-1 aralığı ayarlanmış nükleik asit bölgesi karayosunu gruplarının HCT116 hücrelerine uygulanması sonucu görülen FTIR pik değerleri ve anlamları

3.4.4 FTIR Sonuçlarının Biyolojik Açıdan Önem Analizi

FTIR yorumlanırken, 3600–1200 cm^{-1} ve 1200-700 cm^{-1} aralıkları değerlendirilir. 1. bölge, fonksiyonel gruplar bölgesidir ve organik bir maddenin ışık dizisindeki değişiklikleri içerir. İkinci bölge ise, parmak izi bölgesidir ve moleküldeki en ufak yapısal farklılıklar analiz edilir. Molekülün yapısında ve bileşiminde oluşan bu farklılıklar sonucu, bu bölgedeki absorpsiyon pik yoğunlukları değişkenlik gösterir ayrıca piklerde kaymalar meydana gelir. Dolayısıyla bu bölgedeki değişiklikler bize bazı önemli olayların olduğunu kanıtlamaktadır. FTIR analizi, kızılötesi ışığın kovalent bağlardaki titreşim geçişleri tarafından emilmesine dayanır ve numunenin küresel kimyasal bileşimini izler. Bir hücre spektrumu, tüm hücre bileşenlerinin bir spektrumunun üst üste binmesidir. Dahası, IR spektrumları sadece hücre moleküllerinin kimyasal yapısı için değil, aynı zamanda konformasyonları için de geçerlidir ve özellikle protein ikincil yapısına çok duyarlıdır. Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopi kopyası ile çeşitli kanser türleri için normal ve kanserli hücreler arasındaki değişiklikler gözlenmiştir. Bir prostat kanseri hücre hattı (PC-3) üzerindeki antikanser kardiyotonik steroidlerin belirgin etkileri FTIR spektroskopi ile ayırt edilmiştir. Son zamanlarda, 3 farklı sınıfa ait 7 antikanser ilacının spektral şekilleri analiz edildiğinde benzer tipte metabolik bozuklukların bir araya toplandığı görülmüştür. FTIR spektroskopisi ayrıca hücre farklılaşma süreçlerinin, hücre döngüsü fazlarının ve hücre apoptozunun belirlenmesi için de kullanılmıştır. Bu nedenle, hücre yaşamındaki çeşitli olayların neden olduğu spektral değişiklikler FTIR yöntemi kullanılarak tespit edilebilmektedir. Örneğin, hücrelerde en bol metabolitlerden biri olan fosfat, normal örnekleri, hem polip hem de malign sınıflardan açıkça ayırır. RNA / DNA oranı, yalnızca normal hücreleri kolorektal kanserde oluşan polip ve malign tipteki anormal hücrelerden ayırt edebilir (Argov vd. 2002; Baydston-white vd. 1999; Cohenford ve Rigas, 1998; Derenne vd. 2011; Draux vd 2009; Erkahveci ve Karaali, 1996; Gasper vd. 2010; Goormaghtigh vd. 1994; Gündüz, 2002; Holman vd. 2000; Krafft vd. 2007; Liu vd. 2001; Skoog vd. 2017; Voort, 1992; Zelig vd. 2009).

Tablo 3.4 Kontrol (HCT116), sisplatin ve karayosunu ekstreleri uygulanmış HCT116 hücrelerinin spektrumlarında elde edilen en önemli bantlar atanmış hücresel bileşenlerle titreşim türleri ve pik değerleri

			Kontrol		Sisplatin		K1		K2		K3	
	Pik	**Biyolojik önem**	(cm-1)	yoğunluk	(cm-1)	yoğunluk	(cm-1)	yoğunluk	(cm-1)	yoğunluk	(cm-1)	yoğunluk
Lipitler	1	CH_2 simetrik germe	2854	1,218249	2854	1,171578	2854	1,19049	2854	1,198093	2854	1,214049
	2	CH_3 asimetrik germe	2871	1,238513	2871	1,194158	2871	1,206287	2871	1,21871	2871	1,237164
			2952	1,2750711	2952	1,270438174	2952	1,23862	2952	1,263041	2952	1,271682
	3	O-H simetrik germe	3274	1,722267	3274	1,799305	3274	1,585289	3274	1,768378	3274	1,751866
	4	Asil zincirlerinin (lipidler) CH_2'sinin asimetrik gerilme titreşimi	2922	1,295135	2922	1,24805	2922	1,258067	2922	1,281	2922	1,282265
Proteinler	5	Amid I	1635	1,899696	1635	1,914608	1635	1,764509	1635	1,935134	1635	1,836008
	6	Amid II	1539	1,8344	1539	1,782309	1539	1,721319	1539	1,866507	1539	1,753371
			1570	1,8724137	1570	1,78428	1570	1,698687	1570	1,872589	1570	1,808874
	7	Amid III	1241	1,451737	1241	1,390511	1241	1,381941	1241	1,427837	1241	1,441919
			1307	1,564529	1307	1,491002	1307	1,464257	1307	1,525809	1307	1,573936
	8	Metil protein gruplarının asimetrik CH_3 bükülmesi	1449	1,5360275	1449	1,486945	1449	1,476189	1449	1,537988	1449	1,526508
	9	CH_2 asimetrik bükme, COO- streç (proteinler ve yağ asitleri)	1392	1,7951065	1392	1,709752	1392	1,661571	1392	1,767628	1392	1,802841
Nükleik Asitler	10	Nükleik asit bandı	1072	2,103934	1072	1,906505	1072	1,862301	1072	1,978827	1072	2,094767
		RNA	1021	2,293683	1021	1,973126	1021	1,971337	1021	2,05774	1021	2,329536
	12	DNA	835	1,533343	835	1,466147	835	1,409463	835	1,473774	835	1,546216
	13	Fosfodiester bölgesi	984	1,847404	984	1,573737	984	1,618594	984	1,62832	984	1,875047

Biyokimyasal hücresel parmak izi bölgelerinde, kanser hücrelerinin spektral analizi bazı önemli farklılıklar göstermiştir. Bu da Tablo 3.4'de gösterildiği gibi spesifik absorbans yoğunluğu oranları ile hücre ölümlerinin yansıtılabileceğini göstermiştir (Bellisola, 2012; Boydston ve White, 1999; Erukhimovich, 2010; Gaigneaux, 2002; Ishida, 1993; Mostaço ve Guidolin, 2010; Mordechai, 2001; Sahu, 2008).

C=O ve N-H'den türetilen amid I ve amid II arasındaki absorbans değeri, amid gruplarının gerilme titreşimleri, proteinlerdeki yapısal değişiklikleri ifade etmek için uygulanabilir. Bu durum, hücre hattı absorbans yoğunluğu oranlarına bağlı olarak değişir, protein degradasyon seviyesinin değerlendirilmesini amid absorpsiyonlarının protein konformasyonuna duyarlılığı sağlar. Absorbans oranında bir artış veya azalma ile protein modelinin bileşimindeki değişiklikler belirlenebilir (Bellisola, 2012; Boydston ve White, 1999; Erukhimovich, 2010; Gaigneaux, 2002; Gasparri, 2003; Ishida, 1993; Mordechai, 2001; Mostaço ve Guidolin, 2010; Sahu, 2008).

Tablo 3.5 incelendiğinde, kontrol grubunda (HCT116) amid I / amid II'nin ortalama değeri yaklaşık 1,014'tür ve karayosunu ekstreleri uygulanmış hücrelerde bu oranda artış gözlenmiştir.

RNA/DNA absorbans oranının analizi ile nükleik asit içeriğindeki azalma belirlenebilir. RNA sentezinin başlangıcında ve DNA sentezinin sonunda, RNA/DNA oranı ve RNA sentezi artarken, artmış olan DNA sentezi oranın azalmasına neden olduğundan hücrelerdeki replikasyon seviyesinin belirlenmesi için önemlidir. Tüm karayosunu türlerinde kontrol grubuna kıyasla RNA/DNA oranında bir artış gözlenmiştir. Transkripsiyon artışını RNA/DNA artışı gösterirken; RNA/DNA oranındaki azalma ise, kanser hücrelerinin transkripsiyon sürecine mi girdiği ya da hücre döngüsünün S fazını geçtiği anlamına gelebilir. Ancak daha sonraki hücre döngüsü aşamalarına girip girmedikleri bilinmemektedir. Bu durumda belirlenen amid I/DNA oranındaki artış, hücre döngüsü fazıyla ve nükleik asit içeriğindeki genel azalma ile ilgili yakından ilişkili olabilir ve DNA'nın paketlenmesindeki artış hakkında bilgi verebilir (Gaigneaux, 2002; Lee, 2007, Sahu, 2008).

Tablo 3.5 İnsan HCT116 kolorektal kanser hücre gruplarında seçilen hücresel bileşenler için absorbans yoğunluğu katsayılarının özeti (Gieroba vd. 2020)

Biyolojik önem		**Absorbans yoğunluğu oranı**	**HCT116 Kontrol**	**Sisplatin+ HCT116**	**K1**	**K2**	**K3**
Proteinlerin ikincil yapısı ve DNA içeriği		Amid I/Amid II	1,014571	1,0730423	1,025091224	1,036767609	1,047130356
Transkripsiyon seviyesi		RNA / DNA	1,204821	1,0733828	1,398644023	1,396238501	1,506604511
Kromatin yoğunlaşması		Amid I / DNA	1,238924	1,3058772	1,251901611	1,313046641	1,187420128
Lipid ve protein dağılımı bozuklukları		Amid I / RNA	1,028306	1,2165997	0,895082373	0,940417157	0,788143218
Lipid ve protein dağılımı bozuklukları		Asim. CH_2/CH_3	1,407848	1,3457971	1,042925108	1,051111421	1,036455151
Hücre zarındaki değişiklikler - gözeneklerin ve iyon kanallarının oluşumu	Lipidler : CH_2 sim. germe 2854 cm-1	Amid I / lipid	1,559366	1,634213	1,482170367	1,615178454	1,512301398
	Lipidler: CH_3 asimetrik germe 2952 cm^{-1}	Amid I /Lipid	1,489875	1,5070454	1,482170367	1,615178454	1,512301398

K1 ve K2 türleri uygulanmış HCT116 hücrelerinde kontrol grubuna göre amid I/DNA oranında bir artış (Tablo 3.5), daha fazla kromatin yoğunlaşması ile sağlanabilir (hücreler, mitozun farklı fazlarında olabilir - en büyük kromatin yoğunlaşması metafazda görülür). Buna karşılık, K3'de gözlenen ters eğilim muhtemelen DNA'nın çift sarmalının enzimler yardımıyla açıldığı yoğun DNA replikasyonu ile ilişkilidir (Antonin, 2016; Barth, 2007).

Yağ asitlerinde bulunan CH_2 ve CH_3 gruplarının simetrik ve asimetrik gerilme titreşimleri, 2800 ile 3000 cm^{-1} arasındaki bölgede bulunmaktadır. CH_2 sayısına göre CH_3 sayısının artması, apoptozis sırasında lipid zincirlerinin değişebileceğini göstermektedir. Apoptozis sırasında CH_2'nin simetrik ve antisimetrik gerilmesine atanan 2854 cm^{-1} ± 3 cm^{-1} ve 2952 cm^{-1} ± 4 cm^{-1} bantları her grupta farklı etki göstermektedir. 2952 cm^{-1} ve 2854 cm^{-1}'de artan lipid emilimi apoptoz ve nekroz için ortak bir belirteç olabilir, K1 ve K2 karayosunu ekstraklarında tespit edilebilir (Şekil 3.6). Ancak K3 ve sisplatin uygulanmış gruplarda farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla, CH_2/CH_3 oranındaki artış veya azalma net bir sonuç elde edilmesini sağlamayabilir (Gasparri, 2003).

Protein / lipid absorbans yoğunluğu CH_2/CH_3 oranı ile güçlü bir şekilde ilişkili olup (bu çalışmada amid I/lipidler), hücre zarı içindeki lipid ve protein dağılımındaki sapmalar hakkında ekstra bilgi sağlar. Amid I/lipid emme yoğunluğu oranları analiz edildiğinde, tüm karayosunu ekstraklarının hücre membranlarında bozukluklara yol açtığı saptanabilir. Bu, hem metil (CH_3), hem de metilen (CH_2) gruplarının (Tablo 3.5) absorbansı incelendiğinde amid I/lipid oranında bir azalma söz konusudur. Bu durumun apoptoz ve nekroz sırasında olabileceğini düşündürmektedir. Hem apoptozun, hem de nekrozun aynı anda gerçekleşmesi olasılığı bulunmaktadır (Ahmed, 2009).

Düzensiz yapıdaki DNA'daki deoksiribozun iki farklı C-O titreşiminden kaynaklanan ~ 1020 cm^{-1} absorbans yoğunluğundaki değişiklikler ile apoptoz, nekrozdan ayırt edilmiştir. Tüm karayosunu ekstreleri uygulanmış hücre gruplarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ~ 1021 cm^{-1} ve 1072 cm^{-1}'de nükleik asit bantlarının nispi yoğunluğunda bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.4). Yapılan çalışmalar,

azalmış DNA absorbansının apoptoz ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu, apoptotik DNA'nın daha az IR radyasyonu absorbe etmesiyle açıklanabilir: Bu tip hücre ölümü sırasında DNA'nın bozulmasına rağmen "şeffaf" hale gelir. Bunun aksine, nekroz sırasında DNA bozulur, fakat konsantre edilmez (tam olarak genişler), bu da onun daha fazla kızılötesi radyasyonu emmesini sağlar. Sadece K3 grubundaki artışa bakıldığında, bu hücrelerde nekrozun olduğu söylenebilir (Gasparri, 2003; Zelig, 2009).

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karayosunları oligosakkaritler, polisakkaritler, aminoasitler, yağ asitleri, aromatik ve fenolik bileşikler gibi kendine özgü kimyasal bileşenleri sayesinde antikanser aktivesine sahiptir (Singh, 2013).

Fontinalis antipyretica yosun türü ile yapılan çalışmada bu yosun türünün antimikrobiyal ve antikanser özellikleri araştırılmıştır. Yağsız olan materyal kurutularak, ardından 30 dakika boyunca 40ºC'de metanol:su ile 4 kez ekstrakte edilerek vakum ile konsantre edilmiştir. Sulu faz oda sıcaklığında etil asetat ile ekstrakte edilerek ardından vakumla kuruyana kadar konsantre edilmiştir. Bu ekstraktın aktif bileşeninin sadece 80 ve 160 µg/ml dozlarının, 24 ve 48 saatte doza ve zamana bağlı olarak sıçan glioma (C6) hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görülmüştür. MTT testi ile kanada *Sphagnum* turbasının sıçan bazofilik lösemisi üzerindeki sitotoksisitesini incelenmiş ve düşük dozlarda (0,001-10 µg/ml) 48 saat sonra herhangi bir azalan etki göstermediği bulunmuştur. Farklı bir çalışmaya bakıldığında *Sanionia Georgico-uncinata* yosunundan Sanionin A ve B'nin insan lösemi hücreleri, fare fibroblast hücreleri ve insan karsinom hücreleri üzerinde 72 saat sonra antiproliferatif etkisini gözlemlemiştir. Yine yapılan bir çalışmada karayosunlarında bulunan bibenzil olan lunularik asidin 4 sentetik türevinin, kolon kanseri hücre hattında ve östrojen (-) meme tümör hücrelerinde, hücre büyümesi üzerinde sitotoksisiteye sahip olduğu görülmüştür (Savaroğlu vd. 2011).

Octoblepharum albidum karayosunu türünün etil asetat (EA) ekstraksiyonu yapılarak elemental ve spektral analiz kullanılarak karakterize edilen Duacosterol (1) ve Friedelin (2) olmak üzere bilinen iki metaboliti verilmiştir. EA ve ikincil metabolitlerim, *in vitro* anti-inflamatuar ve antikanser etkileri belirlenmiştir. Antikanser etkisi SRB testi kullanılarak, Yumurtalık (PA1), Servikal (C-33A) ve Akciğer (NCI-H358) hücre hatlarına uygulanmıştır. Çalışma sonucunda ikincil metabolitlerin hücre hatlarına karşı özgüllük gösterdiği görülmüştür. Yine bu metabolitler normal insan meme epiteline uygulanmış ve öldürücü olmayan düşük derecede bir özgüllük sergilemişlerdir (Bharadwaj, 2020).

F. communis ve *F. arrigonii'* den elde edilen Daukan esterlerinin COLO320-HSR ve LS174 kolon kanseri hücrelerinin büyümesini, konsantrasyona bağımlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Yapılan deney çalışmalarında 72 saat süre sonunda IC_{50} dozunun bileşiklerin antiproliferatif kapasitesini azalttığı belirlenmiştir (Poli ve Appendino, 2005).

Yapılan literatür taramasında karayosunlarının genellikle antimikrobiyal etkisi üzerinde durulduğu, antikanser çalışmalarının da yapıldığı fakat yetersiz olduğu tespit edildi. Literatürde HCT116 hücre hattı üzerinde antikanser çalışmasına rastlanmayan *Syntrichia ruraliformis, Hypnum andoi* ve *Plathypnidium riparioides* türü karayosunlarının etil alkol ekstraktı hazırlanarak, MTT yöntemiyle HCT116 hücre hattına karşı sitotoksik etkisi araştırıldı. Yapılan deneylerle IC_{50} değerleri belirlenerek, karayosunu türlerinin sağlıklı hücrelere etkisini anlamak amacıyla aynı dozlar MKH'lara da uygulandı.

Spektroskopisi incelenmek istenen örnek makromolekülleri, fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden yararlanarak kompozisyonel, yapısal ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan tekniğe FTIR (Fourier Dönüşüm Kızılötesi) analizi denir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, işaretleme, boyama gibi ek maddelerin kullanımını içeren uzun örnek hazırlama aşamalarına gerek kalmadan, hızlı, hassas, örneğe zarar vermeden sonuçların daha ucuz bir biçimde elde edilmesi açısından daha avantajlıdır.

Elde edilen bilgiler doğrultusunda moleküllerin fonksiyonel gruplarının tespit edilmesi ve bu şekilde farklı doku yapılarının ayırt edilmesini sağlamaktadır. Böylece doku ve hücrelerde protein, lipit DNA, RNA gibi biyomoleküllerin fiziksel ve yapısal değişimlerinin izlenmesi mümkündür. Bu bilgiler ilk olarak doğru bant tanımlanması daha sonra ise ilgili bantların, bant pozisyonu, sinyal şiddeti/alanı ve bant genişliği değerlerinin hesaplanması ile elde edilir.

Kimyasal konsantrasyon, kompozisyon, konformasyon ve içerilen fonksiyonel gruplar gibi pek çok kantitatif ve kalitatif bilgi elde etmek FTIR spektrumlarında mümkündür. Örneğin, değişik makromoleküllere ait fonksiyonel grupların konsantrasyonları aynı spektrumdan sinyal şiddeti ya da daha hassas olarak bant alanı hesaplanarak Beer-

Lambert yasasına uygun olarak elde edilebilir. Ayrıca bir örnekteki moleküllerin kompozisyonu sinyal şiddeti ya da ilgili bantların alanlarının oranlarının hesaplanması ile (doymamış lipitlerin doymuş lipitlere ya da lipitlerin proteinlere oranı gibi) hızla analiz edilebilir.

Sistemin dinamiğini görüntülemek için temel olarak lipitlerden kaynaklanan CH_2 simetrik ve antisimetrik titreşimlerinin bant genişlikleri kullanılabilir. Yapısal değişimlere, bant pozisyonundaki kaymalar işaret eder. Örneğin, 1730 cm^{-1} civarında görülen C=O gerilme bandının bant pozisyonundaki değişimler bu fonksiyonel grup etrafındaki hidrojen bağlanması hakkında, 3000-2800 cm^{-1} bölgesindeki C-H gerilme bant pozisyonundaki kaymalar, lipitlerin düzen ya da düzensizliklerine olan değişimler hakkında bilgi verir.

Bunun yanı sıra, kontrole karşı olarak yapılan ölçümlerde ana protein bantlarının (amid I) frekans değerlerindeki kaymalar proteinlerin yapılarında oluşabilecek değişimleri işaret eder. FTIR spektroskopisinin diğer önemli bir avantajı ise protein ikincil yapılarında oluşan değişimlerin, 1650 cm^{-1} ve 1550 cm^{-1} civarında gözlenen sırasıyla amid I ve amid II ana protein bantları kullanılarak detaylı bir şekilde incelenebilmesidir (URL-11, 2021).

Bu tez çalışmasında, lama alınarak kurutulan HCT116 hücre örnekleri FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. En çok kullanılan kurutma metodu örneği açıkta bırakarak gerçekleştirilen hava ile kurutma yöntemidir. Diğer yöntemlere kıyasla oldukça ucuz olmasından dolayı tercih edilmektedir. Bu metodun daha uzun zaman alması ve örneğin toz ya da diğer maddeler tarafından kontamisyona açık olması dezavantajıdır. Bununla birlikte küf oluşumunu engellemek için, nemi uzaklaştırmak mümkün olmayabilir. Ancak bu çalışmada kuruma işlemi sadece 24 saatte tamamlanıp hemen okutulduğu için böyle bir negatif etki söz konusu olmamıştır.

Sonuç olarak; *Syntrichia ruraliformis, Hypnum andoi, Plathypnidium riparioides* karayosunu türlerinin HCT116 kolorektal kanser hücre hattına karşı yüksek oranda sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Deney aşamasında karayosunu türlerinin etkisinin daha iyi belirlemenmesi için pozitif kontrol grubu olarak, özellikle kemoterapi tedavisinde etkili bir madde olan sisplatin kullanılmış ve üç karayosunu türünün de IC_{50} değerlerinin, sisplatinden bile daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum tüm bu türlerin sisplatinden daha sitotoksik olduğunu göstermektedir. Ekstreleri hazırlarken kullanılan etil alkol çözücüsünün karayosunu türlerinin bu etkilerini göstermesine katkıda bulunduğu ortaya çıkmıştır. Bunun yanı sıra mezenkimal kök hücrelerine karşı tüm karayosunu türlerinin letal etki göstermemesi ve hücre büyümesini olumsuz etkilememesi bu türlerin sağlıklı hücrelere zarar vermediğinin göstergesidir. Ayrıca, FTIR spektrumu ile elde edilen sonuçların tüm sitotoksik verilerle paralel seyrettiği moleküler düzeyde de belirlenmiştir.

Dolayısıyla bu türler, biyoaktif bileşenleri belirlendiği takdirde, potansiyel kanser ilacı olma özelliğine sahiptirler. Tüm yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda *Syntrichia ruraliformis, Hypnum andoi* ve *Plathypnidium riparioides* karayosunu türlerinin farmakolojik olarak yapılacak olan araştırmalara yardımcı olabileceğini ve elde edilen sonuçların karayosunlarının antikanser aktivitesinin belirlenmesi üzerine yapılacak çalışmalarda, araştırmacılara yardımcı olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte tezde kullanılan üç farklı karayosunu türünün biyoaktif bileşiklerinin tespit edilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Angell, H., & Galon, J. (2013). From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Current opinion in immunology,* 25(2), 261-267.

Abdel-Raouf Ahmed, G., Khorshid, F. A. R., & Kumosani, T. A. (2009). FT-IR spectroscopy as a tool for identification of apoptosis-induced structural changes in A549 cells treated with PM 701. *International Journal of Nano and Biomaterials,* 2(1-5), 396-408.

Akkoca, A. N., Yanık, S., Özdemir, Z. T., Cihan, F. G., Sayar, S., Cincin, T. G., ... & Özer, C. (2014). TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *International journal of clinical and experimental medicine, 7(9), 2828.*

Alataş, M., & Batan, N. (2016). The moss flora of Arapgir (Malatya/Turkey) district. *Biological Diversity and Conservation, 9(2), 102-107.*

Alataş, M., & Batan, N. (2015). The moss flora of Keban (Elazığ/Turkey) district. *Biodicon,* 8(2), 59-65.

Alataş, M., & Uyar, G. (2015). The Bryophyte flora of Abant Mountains (Bolu/Turkey*). Biological Diversity and Conservation,* 8(1), 35-43.

Altuner, E. M. (2008). Bazı karayosunu türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.*

ALTUNER, E. M., ÇETİN, B., & ÇÖKMÜŞ, C. (2010). Tortella tortulosa (Hedw.) Limpr. Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi,* 10(2), 111-116.

Altuner, E. M., & Canlı, K. (2012). In vitro antimicrobial screening of Hypnum andoi AJE Sm. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi,* 12(1), 97-101.

Atherton, I., Bosanquet, S., Lawley, M. (2010*). Mosses And Liverworts Of Ireland a Field Guide. British Bryological society.* United kingdom by Latimer Trend & Co. Ltd, playmouth.

Antonin, W., & Neumann, H. (2016). Chromosome condensation and decondensation during mitosis. *Current opinion in cell biology,* 40, 15-22.

Argov, S., Ramesh, J., Salman, A., Sinelnikov, I., Goldstein, J., Guterman, H., & Mordechai, S. (2002). Diagnostic potential of Fourier-transform infrared microspectroscopy and advanced computational methods in colon cancer patients. *Journal of biomedical optics*, 7(2), 248-254.

Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research:* GCR, 5(1), 19.

Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., & Nagashima, F. (2013). *Phytochemical and biological studies of bryophytes. Phytochemistry*, 91, 52-80.

Asakawa, Y., & Ludwiczuk, A. (2019). *Bryophytes as a source of bioactive volatile terpenoids–A review.* Food and Chemical Toxicology, 132, 110649.

Ashktorab, H., Nouraie, M., Hosseinkhah, F., Lee, E., Rotimi, C., & Smoot, D. (2009). A 50-year review of colorectal cancer in African Americans: implications for prevention and treatment. Digestive diseases and sciences, 54(9), 1985-1990.

Aslan, G. (2014). *Sphagnum capillifolium (Ehrh.) Hedw. ve S. centrale CEO Jensen (Bryophyta)'nın anti-kanser aktivitesinin belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Adnan Menderes Üniversitesi).

Banerjee, H. N., & Verma, M. (2009). *Epigenetic mechanisms in cancer. Biomarkers in medicine,* 3(4), 397-410.

Başer, F. (2016). *Ülkemizde doğal yayılışa sahip karayosunlarından Sphagnum centrale CEO Jensen ve S. Capillifolium (Ehrh.) Hedw'un (Bryophyta) anti-mikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi* (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics,* 1767(9), 1073-1101.

Basile, A., Vuotto, M. L., Ielpo, M. T. L., Moscatiello, V., Ricciardi, L., Giordano, S., & Cobianchi, R. C. (1998). Antibacterial activity in Rhynchostegium riparioides (hedw.) card. extract (bryophyta). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives,* 12(S1), S146-S148.

Bellisola, G., & Sorio, C. (2012). Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *American journal of cancer research*, 2(1), 1.

Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & development*, 23(7), 781-783

Bharadwaj, V. (2020). In-vitro Anti-Inflammatory and Anticancer activities of Octoblepharum albidum Hedw. *American Journal of Medical and Natural Sciences*, 19-24.

Boardman, L. A., Morlan, B. W., Rabe, K. G., Petersen, G. M., Lindor, N. M., Nigon, S. K., ... & Gallinger, S. (2007). Colorectal cancer risks in relatives of young-onset cases: is risk the same across all first-degree relatives?. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(10), 1195-1198.

Bonab, MM, Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, SH, Ghavamzadeh, A. ve Nikbin, B. (2006). Mezenkimal kök hücrenin in vitro yaşlanması. *BMC hücre biyolojisi* , 7 (1), 14.

Botteri, E., Iodice, S., Raimondi, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134(2), 388-395.

Boydston-White, S., Gopen, T., Houser, S., Bargonetti, J., & Diem, M. (1999). Infrared spectroscopy of human tissue. V. Infrared spectroscopic studies of myeloid leukemia (ML-1) cells at different phases of the cell cycle. *Biospectroscopy*, 5(4), 219-227.

Boyle, P., & Langman, M. J. (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *Bmj*, 321(Suppl S6), 0012452.

Candar, C. (2018). Kolorektal kanser tanısı olan hastalarda vitamin d replasmanın prognoz üzerine etkisi.

Cohenford, M. A., & Rigas, B. (1998). Cytologically normal cells from neoplastic cervical samples display extensive structural abnormalities on IR spectroscopy: implications for tumor biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15327-15332.

Compton, C. C. (1999). Pathology report in colon cancer: what is prognostically important. *Digestive Diseases*, 17(2), 67-79.

Coşun, A., Yaşa, M. H., Ayvaz, Ö., Yükselen, V., Ergin, F., & Karaoğlu, A. Ö. (2012). AYDIN BÖLGESİNDEKİ KOLON KANSERLERİNİN ÖZELLİKLERİ. CEP, 41, 48.

Çöteli, E., Alataş, M., & Batan, N. (2017). Syntrichia ruralis ve Syntrichia montana (Pottiaceae) Taksonlarının Glutatyon. Anatolian Bryology, 3(1), 25-30.

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.

Davies, R. J., Miller, R., & Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 199.

Derenne, A., Gasper, R., & Goormaghtigh, E. (2011). The FTIR spectrum of prostate cancer cells allows the classification of anticancer drugs according to their mode of action. *Analyst*, 136(6), 1134-1141.

De Jong, A. E., Morreau, H., Nagengast, F. M., Mathus-Vliegen, E. M., Kleibeuker, J. H., Griffioen, G., & Vasen, H. F. (2005). Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *The American journal of gastroenterology*, 100(1), 139.

Dey, A., & Mukherjee, A. (2015). Therapeutic potential of bryophytes and derived compounds against cancer. *Journal of acute disease*, 4(3), 236-248.

Dikmen, F., & Keçeli, T. (2017). Contributions to the Liverwort Flora (Marchantiophyta) of Gürgenli Mountain (Bayramören/Çankırı). *Anatolian Bryology*, 3(2), 48-57.

Draux, F., Jeannesson, P., Gobinet, C., Sule-Suso, J., Pijanka, J., Sandt, C., ... & Sockalingum, G. D. (2009). IR spectroscopy reveals effect of non-cytotoxic doses of anti-tumour drug on cancer cells. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(7), 2293-2301.

Ezer, T., Yılmaz, T., İşlek, C., & Türkyılmaz-Ünal, B. (2016). Impact of heavy metals (zinc and lead) on the photosynthetic pigment contents of Bryum schleicheri and Plagiomnium undulatum (Bryophyta). *Biol Divers Conserv*, 9, 122-127.

Erdağ, A., & Kürschner, H. (2017). *Türkiye bitkileri listesi*:(Karayosunları). ANG Vakfı.

Erkahveci, A., & Karaali, A. (1996). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisinin gıda analizlerine uygulanması. *GIDA (1996)*, 21(5), 337-345.

Fairley, T. L., Cardinez, C. J., Martin, J., Alley, L., Friedman, C., Edwards, B., & Jamison, P. (2006). Colorectal cancer in US adults younger than 50 years of age, 1998–2001. *Cancer*, 107(S5), 1153-1161.

Gaigneaux, A., Ruysschaert, J. M., & Goormaghtigh, E. (2002). Infrared spectroscopy as a tool for discrimination between sensitive and multiresistant K562 cells. *European journal of biochemistry*, 269(7), 1968-1973.

Gasper, R., Mijatovic, T., Bénard, A., Derenne, A., Kiss, R., & Goormaghtigh, E. (2010). FTIR spectral signature of the effect of cardiotonic steroids with

antitumoral properties on a prostate cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1802(11), 1087-1094.*

Gasparri, F., & Muzio, M. (2003). Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemical Journal*, 369(2), 239-248.

Gieroba, B., Arczewska, M., Sławińska-Brych, A., Rzeski, W., Stepulak, A., & Gagoś, M. (2020). Prostate and breast cancer cells death induced by xanthohumol investigated with Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 231, 118112.

Geissman, T. A. (1963). Flavonoid Compounds, Tannins, Lignins and, Related Compounds. *In Comprehensive biochemistry* (Vol. 9, pp. 213-250). Elsevier.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., & Ruysschaert, J. M. (1994). Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. *Physicochemical methods in the study of biomembranes*, 405-450.

Grande, M., Milito, G., Attinà, G. M., Cadeddu, F., Muzi, M. G., Nigro, C., & Farinon, A. M. (2008). Evaluation of clinical, laboratory and morphologic prognostic factors in colon cancer. *World journal of surgical oncology*, 6(1), 98.

Grunstein, M. (1990). Histone function in transcription. *Annual review of cell biology*, 6(1), 643-676.

Frezza, E. E., Wachtel, M. S., & Chiriva-Internati, M. (2006). Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut*, 55(2), 285-291.

Gündüz T. 2002. İnstrümental Analiz. 6. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara, s. 1357.

Haggar, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*, 22(04), 191-197.

Harrington, K. J. (2016). The biology of cancer. *Medicine*, 44(1), 1-5.

Hazer, Y. (2017). Bryofitlerden Elde Edilen Fenolik Bileşikler. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 7(1), 333-340.

Herbert, H., & Prins, T. (1982). Why are mosses eaten in cold environments only?. *Oikos*, 374-380.

H.-Y.N. Holman, M.C. Martin, E.A. Blakely. K. Blakely, K. Bjarnstad, W.R Mckinney. IR spectroscopic characteristics of cell cycle and cell dearth probed

by synchrotron radiation based Fourier transform IR spectromicroscopy. Biopolymers 57 (2000) 329-335.

Horton, K. M., Abrams, R. A., & Fishman, E. K. (2000). Spiral CT of colon cancer: imaging features and role in management. *Radiographics*, 20(2), 419-430.

Ishida, K. P., & Griffiths, P. R. (1993). Comparison of the amide I/II intensity ratio of solution and solid-state proteins sampled by transmission, attenuated total reflectance, and diffuse reflectance spectrometry. *Applied spectroscopy*, 47(5), 584-589.

Janout, V., & Kollárová, H. (2001). Epidemiology of colorectal cancer. *Acta-Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae*, 5-10.

Johnson, I. T., & Lund, E. K. (2007). Nutrition, obesity and colorectal cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(2), 161-181.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692.

Kaya, S. (2008). Kolorektal Kanserli Hastalarda Survivin Expresyonunun Sağkalım ve Histopatolojik Değişkenlerle İlişkisi, *Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi.*

Kırmacı, M., & Agcagil, E. (2018). The bryophyte flora of Fethiye Babadağ (Muğla/Turkey). *Anatolian Bryology*, 4(1), 17-30.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.

Krafft, C., Salzer, R., Seitz, S., Ern, C., & Schieker, M. (2007). Differentiation of individual human mesenchymal stem cells probed by FTIR microscopic imaging. *Analyst*, 132(7), 647-653.

Kumar, P., Nagarajan, A. ve Uchil, PD (2018). MTT testi ile hücre canlılığının analizi. *Cold Spring Harbor Protokolleri* , 2018 (6), pdb-prot095505.

Labianca, R., Beretta, G. D., Mosconi, S., Milesi, L., & Pessi, M. A. (2005). Colorectal cancer: *screening. Annals of oncology*, 16(suppl_2), ii127-ii132.

LB. Mostaço-Guidolin, LS. Murakami, M.R Batistuti, A. Namizo, B. L, Moleculer and chemical Characterization by Fourier transform infrared spectrodcopy of human breast cancer cell with estrogen receptor expressed, Spectroscopy 24 (5) (2010) 501-510.

Lee, S. H., Kim, H. J., Lee, J. S., Lee, I. S., & Kang, B. Y. (2007). Inhibition of topoisomerase I activity and efflux drug transporters' expression by xanthohumol from hops. *Archives of pharmacal research*, 30(11), 1435-1439.

Liu, K. Z., Jia, L., Kelsey, S. M., Newland, A. C., & Mantsch, H. H. (2001). Quantitative determination of apoptosis on leukemia cells by infrared spectroscopy. *Apoptosis*, 6(4), 269-278.

Lynch, H. T., Lynch, J. F., Lynch, P. M., & Attard, T. (2008). Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Familial cancer,* 7(1), 27-39.

Madigan T.M. an Martinko, MJ. , Mikroorganizmaların biyolojisi 11th ed, cumhur çökmüş, *Palme yayıncılık,* Ankara, 2010.

McLean, M. H., Murray, G. I., Stewart, K. N., Norrie, G., Mayer, C., Hold, G. L., ... & El-Omar, E. M. (2011). The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One,* 6(1), e15366.

Mežaka, A., Brūmelis, G., & Piterāns, A. (2008). The distribution of epiphytic bryophyte and lichen species in relation to phorophyte characters in Latvian natural old-growth broad leaved forests. *Folia Cryptogamica Estonica*, 44, 89-99.

Mežaka, A., & Znotiņa, V. (2006). Epiphytic bryophytes in old growth forests of slopes, screes and ravines in north-west Latvia. *Acta Universitatis Latviensis*, 710, 103-116.

Minguell, JJ, Erices, A. ve Conget, P. (2001). Mezenkimal kök hücreler. *Deneysel biyoloji ve tıp* , 226 (6), 507-520.

Motamedian, B. (2017). *Kolorektal kanser hastalarının tanı almadan önceki beslenme alışkanlıklarının incelenmesi* (Master's thesis, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Mordechai, S., Mordehai, J., Ramesh, J., Levi, C., Huleihal, M., Erukhimovitch, V., ... & Kapelushnik, J. (2001, November). Application of FTIR microspectroscopy for the follow-up of childhood leukemia chemotherapy. *In Subsurface and Surface Sensing Technologies and Applications III* (Vol. 4491, pp. 243-250). International Society for Optics and Photonics.

Mulder, S. A., Kranse, R., Damhuis, R. A., de Wilt, J. H., Rob, J. T., Kuipers, E. J., & van Leerdam, M. E. (2011). Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer: a Dutch population-based study. Cancer Epidemiology, 35(5), 442-447.

Murshed, H. (2019). *Molecular Cancer Biology. Fundamentals of Radiation Oncology,* 89-104.

Okugawa, Y., Grady, W. M., & Goel, A. (2015). Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. *Gastroenterology*, 149(5), 1204-1225.

Oylar, Ö., & Tekin, İ. (2011). Kanserin teşhis ve tedavisinde nanoteknolojinin önemi. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering,* 16(1).

Öner, G. Ö. (2014). Kolon Kanserli Hastalarda Interlökin 21 ve Interlökin32 Gen Ekspesyon Düzeyleri ve Metastaz Ilişkisi.

Özkan S., (1999). Psikiyatrik ve psikososyal açıdan kanser. *Konsültasyon Liyezon psikiyatrisi* 1998-1999. İstanbul, s.140-152

Özkan, Ö. F., Kaya, Ü., Güner, A., Cevizci, S., Özkul, F., Sezer, C., & Reis, E. (2012). Bir eğitim ve araştırma hastanesinde kolorektal kanser hastalarının demografik dağılımı ve hastalık özellikleri. *Pamukkale Tıp Dergisi*, (3), 132-135.

Parizadeh, S. M., Jafarzadeh-Esfehani, R., Hassanian, S. M., Parizadeh, S. M. R., Vojdani, S., Ghandehari, M.,& Asgharzadeh, F. (2019). Targeting cancer stem cells as therapeutic approach in the treatment of colorectal cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology,* 110, 75-83.

Poli, F., Appendino, G., Sacchetti, G., Ballero, M., Maggiano, N., & Ranelletti, F. O. (2005). Antiproliferative effects of daucane esters from Ferula communis and F. arrigonii on human colon cancer cell lines. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives,* 19(2), 152-157.

Porcellini, E. , Laprovitera, N. , Riefolo, M. , Ravaioli, M. , Garajova, I. , & Ferracin, M. (2018). *Epigenetic and epitranscriptomic changes in colorectal cancer: Diagnostic, Prognostic, and tretment implications. Cancer Letters,* 419, 84-95.

Pöschl, G., ve Seitz, HK (2004). Alkol ve kanser. *Alkol ve alkolizm* , 39 (3), 155-165.

Ries, L. A., Harkins, D., Krapcho, M., Mariotto, A., Miller, B. A., Feuer, E. J., ... & Hayat, M. (2006). SEER cancer statistics review, 1975-2003.

Rodríguez-Paredes, M., & Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine,* 17(3), 330.

Sahu, R. K., Mordechai, S., & Manor, E. (2008). Nucleic acids absorbance in mid IR and its effect on diagnostic variates during cell division: A case study with lymphoblastic cells. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules,* 89(11), 993-1001.

SAVAROĞLU, F., İŞÇEN, C. F., VATAN, A. P. Ö., Kabadere, S., Ilhan, S., & Uyar, R. (2011). Determination of antimicrobial and antiproliferative activities of the aquatic moss Fontinalis antipyretica Hedw. *Turkish Journal of Biology*, 35(3), 361-369.

Saxena, D. (2004). *Uses of bryophytes. Resonance*, 9(6), 56-65.

Singh, S., & Srivastava, K. (2013). *Bryophytes as Green Brain: Unique and Indispensable Small Creature. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research,* 23(2), 28-35.

Sinha, R. (2002). An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,* 506, 197-204.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.

Smith, A. (1978). The Moss Flors Of Britain & Ireland. Great Britain by W & J Mackey Ltd, Chatham. Australia

Strong, T. V. (2018). *Cancer Genetics and Biology. Pediatric Cancer Genetics*, 41-46

Spjut, R. W., Suffness, M., Cragg, G. M., & Norris, D. H. (1986). *Mosses, liverworts, and hornworts screened for antitumor agents. Economic Botany*, 40(3), 310.

Tekerlek, P. (2013). *Bazı bryofit türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Niğde Üniversitesi).

Terzi, C., & ÜNEK, T. (2004). Kolon Kanserinde Cerrahi Tedavi. *Turkiye Klinikleri Journal of Surgery*, 9(1), 71-80.

Van de Voort, F. R. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*, 25(5), 397-403.

Yeung, TM, Gandhi, SC, Wilding, JL, Muschel, R. ve Bodmer, WF (2010). Kolorektal kanser kaynaklı hücre dizilerinden kanser kök hücreleri. *Ulusal Bilimler Akademisi Bildirileri* , 107 (8), 3722-3727.

Yıldız, Z. D. (2013). *Kolon Kanserli Hastalarda Paraoksonaz ve Arilesteraz Aktivitesi* (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).

Yıldız, M. K. (2008). *Evre ı-ıı kolon kanserinde prognostik faktörlerin araştırlması* (Master's thesis).

Yıldız, B., & Aktoklu, E. (2010). Bryophyta (Karayosunları). *Bitki Sistematiği İlkin Karasal Bitkilerden Bir Çeneklilere.* 2.Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık.

Zelig, U., Kapelushnik, J., Moreh, R., Mordechai, S., & Nathan, I. (2009). Diagnosis of cell death by means of infrared spectroscopy. *Biophysical journal*, 97(7), 2107-2114.

Zisman, A. L., Nickolov, A., Brand, R. E., Gorchow, A., & Roy, H. K. (2006). Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Archives of internal medicine*, 166(6), 629-6

URL-1.http://www.biopix.com/ adlı internet sitesinden 22.07.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-2.https://en.wikipedia.org/ adlı internet sitesinden 22.07.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-3.https://en.wikipedia.org/ adlı internet sitesinden 22.07.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-4.https://www.mountainmoss.com/ adlı internet adresinden 22.07.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-5.https://en.wikipedia.org/ adlı internet sitesinden 22.07.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-6.https://fr.wikipedia.org/ adlı internet sitesinden 05.06.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-7.http://www.cisfbr.org.uk adlı internet sitesinden 03.03.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-8.https://commons.wikimedia.org/ adlı internet sitesinden 03.03.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-9.https://www.mdpi.com adlı internet sitesinden 06.05.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-10.https://sites.cortland.edu/ adlı internet sitesinden 03.03.2019 tarihinde alınmıştır.

URL-11.https://acikders.tuba.gov.tr/pluginfile.php/1108/mod_resource/content/0/konu11.pdf adlı internet sitesinden 15.04.2021 tarihinde alınmıştır.