

BİYOLOJİDE Yeni Gelişmeler Işığında Güncel Konular



Editör
Ali BİLGİLİ

BİDGE Yayınları

Biyolojide Yeni Gelişmeler Işığında Güncel Konular

Editör: Prof. Dr. Ali Bilgili

ISBN: 978-625-372-186-2

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.06.2024

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



ÖNSÖZ

Çeşitli endüstriyel ve tarımsal atıkların üzerinde yaşayabilen mantarlar kirleticileri ayrıştırabilen, yaşadıkları alanlarda biyolojik çeşitliliği artıran ve miselli yapılarından dolayı doğadaki besin iletiminde önemli görevleri olan canlılardır. Ayrıca birçok bitkisel, endüstriyel ve tarımsal atığın da değerlendirilmesinde önemli rolleri vardır. Bu kitapta çevrenin iyileştirilmesinde biyoremediasyonda kullanılan canlılar ve özellikle biyoremediasyon uygulamalarında kullanılan mantarlar kapsamlı şekilde ele alındı.

Çok hücreli canlılar homeostazisini koruyabilmek için mitoz, farklılaşma, hücre ölümü gibi süreçlerden geçmektedir. Bu kitapta kanser ve hücre ölüm yolları ayrıntılı şekilde ele alındı.

Yine okratoksin üreten *Aspergillus* türleri ve dünyada farklı bölgelerden toplanan üzümlerden izole edilen *Aspergillus* türlerinin okratoksin üretme durumları ayrıntılı şekilde açıklandı.

Ayrıca bu kitapta enzim hızına etki eden faktörler ve etkileri de gösterildi.

Kitapta yer alan konular kapsamı itibarıyla biyoloji alanında çalışanların yararlanabileceği güncel bilgileri içeren temel bir kaynak şeklinde okuyucularına sunulmuştur.

Editör

Prof. Dr. Ali BİLGİLİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	3
İÇİNDEKİLER	4
Enzimin Çalışma Hızına Etki Eden Etkenlerin İncelenmesi	5
Fatih SEZEK	5
Kemal DOYMUŞ	5
Kirlenmiş Alanlarda Biyoremediasyon Ajanları (Algler ve Mantarlar).....	31
Nezahat KANDEMİR.....	31
Kanserde Hücre Ölüm Yolaklarının Önemi.....	74
Ayşe Müge ALDIRAN.....	74
Gül ÖZCAN	74
Üzümlerde Okratoksijenik <i>Aspergillus</i> Varlığı.....	119
Gülçin ÖZCAN ATEŞ	119
Nükhet Nilüfer ZORBA	119
Burhan ŞEN	119
Pankreas ve Akciğer Kanserlerinde Fare Modeli Uygulamaları .	156
Aybike SARIOĞLU BOZKURT	156
Onur ONGUNCAN	156
Akciğer Kanserinde İmmunoterapötik ve Nanomedikal Tedaviler	179
Fatma SEÇER ÇELİK	179

BÖLÜM I

Enzimin Çalışma Hızına Etki Eden Etkenlerin İncelenmesi

Fatih SEZEK¹
Kemal DOYMUŞ²

GİRİŞ

Bu bölümün amacı, enzim hızına etki eden etkenlerin basit malzemelerden oluşan ev deneyleriyle anlatılmasıdır. Katalaz enzimi peroksizomlarda üretilen ve metabolik faaliyetler sonucunda oluşan ve hücre için zehirli bir atık madde olan hidrojen peroksiti (H_2O_2) su (H_2O) ve oksijene ($1/2O_2$) parçalamaktadır. Katalaz enzimi görevini yaparken çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Çünkü protein yapıda olduğu için proteinleri etkileyen her şey enzimleri de etkilemektedir. Bu durum enzimin çalışma hızını etkilemektedir. Kimyasal reaksiyonun hızı açığa çıkan O_2 gazının

¹ Prof Dr. Atatürk Üniversitesi, ORCID: 0000-0002-1841-4303, fsezek@gmail.com

² Prof Dr. Atatürk Üniversitesi, ORCID: 0000-0002-0578-5623,
kemaldoymus1@gmail.com

köpürmesiyle ölçülebilmektedir. Çalışmada deney malzemesi olarak bardak, karaciğer, şırınga, lastik eldiven, hidrojen peroksit veya peroksit içerikli deterjanlar gibi evlerimizde veya sıradan marketlerde bile ulaşılabilecek malzemeler tercih edilmiştir. Ayrıca malzeme temininin kolay olması için farklı seçeneklerde verilmiştir. Malzemelerin insan sağlığına mümkün olduğu kadar zararsız veya az zararlı olmasına dikkat edilmiştir. Maliyetinin ucuz olması için tavuk karaciğeri, koyun, sığır karaciğeri veya bitkisel dokular önerilmektedir. Ayrıca, kırsalda köylerde eczaneden hidrojen peroksit'e ulaşmanın zor olacağı düşünülerek, marketlerde bulunabilecek hidrojen peroksitli deterjanlar önerilmektedir. Deneylerin yapılış aşamaları sırasıyla verilmiştir. Deney sonunda fark edilmesini istediğimiz bilimsel süreç becerilerini ve moleküler seviyede düşünmeyi gerektirecek sorular konmuştur. Böylece öğrencilerin doğru öğrenmeleri ve kavramları anlamaları sağlanmaya çalışılmaktadır. Öğrencilerinden grafik, gözlem, yorum yapmaları ve verileri kaydetmeleri istenmiştir. Kitabın bu bölümünde ev deneylerinde enzim hızına etki eden bazı faktörler ve etkileri incelenmeye çalışılmıştır. Bu bölümlerle ilgili yapılan bazı çalışmalar göz atacak olursak: Bireylerin yeteneklerinin keşfedilmesi ve geliştirilmesi ancak laboratuvar çalışmalarıyla mümkündür (Üstüner & Sancar,1999). Bazı eğitimciler hiçbir fen bilim dalında deneylere yer vermeden tam olarak öğretilmeyeceğini belirtmişlerdir (Çepni & Ayvaci, 2006:159). Yapılan deneylerle öğrencilerin yeni bilgileri keşfetmesi, mevcut bilgilerinin doğruluğunu test etmeyi, sonuçları analiz ederek yeni bilgiler elde etmeyi, bilimin doğası ve bilimsel bilginin ne olduğunu anlamayı, bilimsel yöntemlerin hangi süreçleri izlediğini öğrenirler.

Laboratuvar alışmaları soyut ve karmaşık kavramların öğretilmesinde etkilidir. Öğrencilerin derin dűřünme, gözlem yapma, fikir üretme ve yorumlama yapma yeteneklerinin gelişmesini sağlar (inici & ark., 2013; Korkmaz & Kaptan, 2001). Kısaca bilime, bilimin doğasının anlaşılmasına ve insanlığa büyük katkıları vardır.

Bazı fen konularının zor öğrenilmesinin pek çok sebebi olabilir. İlki, fen kavramlarının büyük çoğunluğunun moleküler boyutla ilişkili olması nedeniyle birçok çalışmada öğrencilerin anlamakta güçlük çektikleri ifade edilmektedir (Kalın & Arıkıl, 2010; Haigh, France & Gounder, 2011; Okumuş & ark., 2014; Sinan & ark., 2006; Sinan, 2007; Linenberger & Bretz, 2012). İkincisi, bir kavramın pek çok kavramla ilgili olmasıdır. Örneğin enzim hızına etki eden etkenler substrat, inhibitör, PH, zaman gibi birbiriyle ilişkili pek çok kavramlarla da ilgilidir. Buna benzer konular fizik, kimya ve biyoloji bilim dallarının kesiştiği alanlardır. Her bir bilim dalında bu kavramlara farklı yaklaşıldığı algısı da bulunabilir. Üçüncüsü, sembolik ve büyük ölçekli olayların veya durumların anlaşılması moleküler boyuttaki olayların anlaşılmasından daha kolaydır. Öğrenciler tarafından bazı konuların öğrenilmesinin zor görülmesinin temelinde; moleküler boyutu tam olarak anlayamadıkları, açıklayamadıkları, olayları zihinlerinde canlandıramadıkları ve günlük hayatla ilişkilendiremedikleri belirlenmiştir (Abraham, Williamson & Wrestbook, 1994; Adadan, 2012; Adadan, Trundle & Irving, 2010; alık, Ayas & nal, 2006; Demircioğlu & ark., 2012; Franco & Taber, 2009; Kaya, 2017; Okumuş & ark., 2014; 2017; Smith & Villarreal, 2015; Talanquer, 2011). Ayrıca, zmen (2011) alışmasında her sınıf düzeyinde

öğrenim gören öğrencilerin mikroskobik boyutu anlamalarında eksiklikler olduğunu belirlemiştir.

Diğer yandan, etkili laboratuvar deneyleri yapmanın bilimsel süreç becerilerinin kazanılmasında son derece faydalı olacağını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Duru vd., 2011; Harlen, 1999; Huppert, Lomask & Lazarorcitz, 2002). Laboratuvar etkinlikleri öğrencilere bilimsel çalışmanın; gözlem yapma, sınıflandırma, veri toplama ve kaydetme, rapor yazma, açıklama ve deney yapma gibi bilimsel süreç becerilerini geliştirme konusunda önemli katkılar sağlamaktadır (Aydoğdu & Kesercioğlu, 2005). Bu beceriler “fen bilimlerinde öğrenmeyi kolaylaştıran, öğrencilerin aktif olmasını sağlayan, kendi öğrenmelerinde sorumluluk alma duygusunu geliştiren, öğrenmenin kalıcılığını artıran, araştırmacı aklını ve yöntemlerini kazandıran temel beceriler” olarak tanımlanmıştır (Çepni & ark., 1996). Laboratuvar çalışmalarının problem çözme becerilerini geliştirdiği tespit edilmiştir (Bozdoğan, Taşdemir & Demirbaş, 2006; Monhardt & Monhardt, 2006). Bütün bu yeteneklerin bilimsel süreç becerilerinin gelişmesinde büyük katkıları olacaktır.

Rowland, Stuessy & Vick (1987) laboratuvarların BSB’ ne dayalı yapılması hususunda üç sebep göstermiştir. Birincisi, doğal dünyayı anlamının fenne dayalı bir yoludur. İkincisi, öğrencilerin bir bilim adamının doğal yaşamdaki olayları, ilkeleri ve ilişkileri keşfetme sürecinde izlediği yolu daha iyi anlamalarına imkân verecektir. Üçüncüsü, öğrencilerin aktif katılımını sağladığı için bilimsel tutumun gelişmesine katkı sağlayacaktır.

Bilimsel Süreç Becerileri farklı sınıflandırmalar yapılsa bile genel olarak; gözlem, ölçme ve sınıflama yapma, sayı-uzay ilişkileri kurma, tahminde bulunma, verileri kaydetme, kullanma ve yorumlama, model oluşturma, sonuç çıkarma, değişkenleri belirleme, değiştirme ve kontrol etme, hipotez kurma ve yoklama, deney yapma becerilerini içermektedir (Temiz & Tan, 2003). Yukarıdakinden farklı olarak; problemi bulma (soru üretme, problemi belirleme); hipotezleri formüle etme (hipotez kurma, değişkenleri belirleme); hipotezleri test etme (deneyi tasarlama, ölçme, verileri toplama, verileri sunma, değerlendirme) şeklinde de sınıflandırılmaktadır (Aktamış & Ergin, 2007).

İlgili alan yazında, öğretmenlerin fen eğitiminde laboratuvarın öneminin farkında oldukları, laboratuvar için yeterli bilgiye sahip olmaları gerektiğini düşündükleri, laboratuvarlar ile ilgili yayın ve gelişmelerin takip edilmesi gerektiğini savundukları görülmektedir. Ancak bu konuda kendilerini mesleki nitelikler açısından yeterli bulmadıkları, fen ve teknoloji alanında bilgilerini yenilemeleri gerektiği konusunda fikir birliği içinde oldukları görülmüştür (Türk, 2010; Macaroğlu, 1995; Muşlu Kaygısız, Benzer & Uçar, 2017; Taşçı & Soylu, 2015). Öğretmenlerin laboratuvar becerilerindeki eksiklerin öğretimin kalitesini büyük oranda etkileyeceği aşîkârdır. Bu durum laboratuvar alanında nitelikli, iyi donanımlı, bilimsel dile aşına, bilimsel süreç becerilerine (BSB) sahip, fen bilgisi öğretmenlerinin yetiştirilmesine daha çok önem verilmesi gerektiğinin bir göstergesidir (Cotabish & ark., 2011).

Laboratuvar deneylerinin sağladığı tartışmasız faydalar onları eğitimde vaz geçilmez yapmaktadır. Ancak bazı sınıflarda ders saatlerinin yetersizliği, müfredat içeriklerinin yoğunluğu, okul

imkânlarının yetersizliği, sosyal medyanın yaygınlaşması, yeni teknolojiler, dünyada yaşanan salgınlar, ülkemizde yaşanan deprem sonrası bazı şartların uzaktan eğitimi zorunlu hale getirmesi gibi daha burada saymadığımız pek çok etken farklı deney tasarımları yapmayı zorunlu hale getirmiştir. Bu durum eğitimcileri yeni ve farklı imkânları araştırmaya sevk etmektedir. Bunlardan birisi de sanal laboratuvar ortamlarıdır. Özellikle fen konuları için tasarlanmış sanal laboratuvar ortamlarının da yaygın kullanıldığı ve bilgisayarların eğitimle bütünleşmiş olduğu görülmektedir (Wilson & Redish, 1989; Borgi, 1991; Al-Holou & Clum, 1999; Pektaş vd., 2009; Akkağıt & Tekin 2012; Çinici & ark., 2013, Çivril, 2018; Mırçık-Karagöz & Saka, 2016; Duman & Avcı, 2016; Köse, Ayas & Taş, 2003). Her ne kadar ekonomik olduğu, laboratuvar imkânları kısıtlı olan okullarda faydalı olacağı ve defalarca tekrarlanabileceği ifade edilse de sanal laboratuvar uygulamalarının da zayıf yönleri vardır. Akgül & ark., (2018)' e göre; bazı biyoloji konularını içeren sanal laboratuvar ortamlarının yeterli olmadığını belirtmektedirler. Bu araştırmacılar enzimlerin çalışma hızına etki eden etkenler için sanal bir laboratuvar ortamı tasarlanmıştır. Geleneksel-Sanal deneylerin yapıldığı ve yalnızca sanal deneylerin yapıldığı iki grup kullanmışlardır. Denekler sanal laboratuvar ortamlarının gerçeklikten uzak olduğunu, hareketlerinin bu ortamlarda sınırlandırıldığını, dokunma, hissetme, gözlemlleme gibi faaliyetleri yapamadıklarını ifade etmişleridir. Yani öğrenciler kendi gözleri dışında da diğer duyarlarını kullanarak hissetmek istemektedirler. Her şeyi ile kendilerine hazırlanmış olanı değil, yönergelerle yapabilecekleri ve dokunabilecekleri deneyler istemektedirler. Bu durum da bizlere asıl olanın deney yapmak olduğunu, sanal

laboratuvarın ise desteklemek için kullanılabileceğini işaret etmektedir.

Basit malzemelerle ev deneyleri yapmanın eğitim açısından pek çok faydası bulunmaktadır. Öğrencilerin okula bağlı kalmadan öğrenmesini sağlar. Yer ve zaman kısıtlaması yoktur. Gerçek zamanlı gerçek deneyler yapabilirler. Öğrencilerin ihtiyaçlarına uygun bireysel öğrenme sağlar. Erişilebilir ve esnek bir öğrenme ortamı sağlar. Maliyet açısından tasarruf sağlar. Ancak öğrenciler kitapta yerli şekil ve açıklama yoksa deneyleri nasıl yapacağını yeterli düzeyde anlayamayabilirler. İstenen malzemeye ulaşamamak veya ebeveynlerin yeterli düzeyde destek vermemeleri öğrenme arzusunu kırabilir. Bu nedenle ev deneyleri tasarlanırken malzemelere ulaşılabilirlik, maliyet ve öğrencilerin rahatlıkla yapabilecekleri seviyede deneyler olmasına önem göstermeliyiz.

Özetle, fen öğretimi yapacak olan öğretmen adaylarının BSB'lerini kazandıracak şekilde düzenlenmiş deneyler yaptırıp, her adımında öğrencilerin mukayese ve tartışma yapmalarını sağlayacak, anlamalarını kolaylaştırıcı, farklı ölçeklerde (büyük, sembolik ve moleküler) yoruma dayalı ve sorularla deneylerin desteklenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Bu Deneylerin Amacı

1. Benzer çalışmalar laboratuvar ortamlarında öğrenci deneyi olarak yaptırılmaktadır. Ancak bu deneylerin ev ortamında da güvenle yapılabileceği kanaatindeyiz. Önceliğimiz “enzimlerin çalışmasına etki eden faktörler” konusunda araştırmacılar tarafından tasarlanan ve ev ortamında yapılabilecek farklı seçenekleri olan

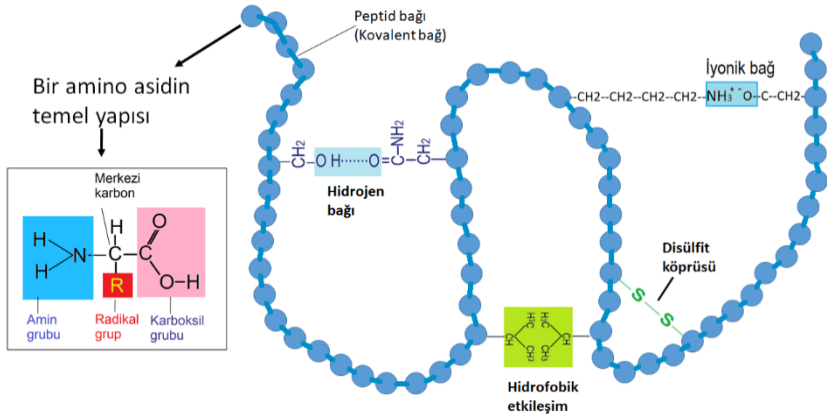
deneyler tasarlamaktır. Enzim hızına etki eden faktörleri ev ortamında basit malzemelerle inceleyebilir miyiz?

2. Deneylerle ilgili düşündürücü, araştırmaya sevk edici, bilimsel süreç becerilerini de kullanmayı gerektiren açık uçlu sorular sorulmuştur. Bu deneylerle öğrencilerin BSB' lerini kazanmasında katkıda bulunabilir miyiz?

2. YÖNTEM

Kısa Bir Ön Bilgi

Enzimler canlılarda kimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjilerini düşüren biyoloji katalizörlerdir. Enzimlerin temel yapısı proteinlerden meydana gelmektedir. Proteinlerin temel yapı birimleri ise amino asitlerdir. Bütün amino asitlerde amin, karboksil, merkezi karbon atomu ve radikal gruplar olmak üzere dört kısımdan meydana gelir. 20 çeşit amino asit vardır. Farklı amino asitlerde radikal gruplar farklıdır. Radikal gruplar yasına göre suyu seven, suyu sevmeyen, nötr, polar veya aromatik özelliklerde olabilir. Her bir amino asidin protein zincirindeki sırası önemlidir. Çünkü radikal gruplar etkileşerek proteinin nasıl ve nereden katlanacağını belirler. Radikal gruplar birbirleriyle ve içinde bulundukları ortamla etkileşerek proteinlerin üç boyutlu yapısını meydana getirirler. Aşağıda bir protein molekülü ve radikal grupların etkileşimini görüyorsunuz. Şekil 1'i inceleyerek böyle bir yapının nelerden ve nasıl etkilenebileceği hakkında fikirlerinizi yazınız.



Şekil 1: Proteinlerin ve aminoasitlerin temel yapısı

Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

Şekil 1 hakkında sorular:

- Proteinlerin amino asit sırası niçin çok önemlidir? Tartışınız?
- Protein molekülünün temel yapısı birimi nedir?
- Amino asitler arasındaki bağıın adı nedir? Güçlü bir bağ mıdır?
- Şekil üzerinde amino asitlerin radikal gruplarını gösteriniz?
- Protein molekülünün katlanmasına sebep olan bağlar hangileri? Güçlünden zayıfa sıralayınız?
- Protein molekülünün katlanmasına sebep olan bağlar nelerden etkilenebilir? Neden?

Deneyle ilgili ön açıklamalar

1- Tavuk ciğeri, koyun veya sığır ciğeri kullanılabilir. Maliyet açısından tavuk ciğeri daha ucuzdur. Marketlerde paketli olarak satılmaktadır. Çiğ olmak şartıyla evinizde bulunan bitkilerin (avakado, muz, patates, marul, kivi, çilek vs.) kök, gövde veya yaprakları kullanılabilir. Bunlardan yalnızca birisini seçerek deneyi yapabilirsiniz. Ancak bu deneyde sonuçları daha net görmek için en ideali ciğerdir.

2- Hidrojen peroksiti eczanelerden oksijenli su diye alabilirsiniz. Alacağınız hidrojen peroksit şişesi küçük ise deney yapmadan önce bütün deneylerde gerekecek H_2O_2 miktarını hesaplayınız. Buna göre kaynayıp soğutulmuş su ile peroksiti seyreltiniz. Böylece bütün deneyleri yapacak kadar peroksitiniz olacaktır. Hidrojen peroksitin ortalama derişiminin % 1- 4 arasında olması yeterlidir.

3- Eğer H_2O_2 pahalı diyorsanız piyasada saç ağarmak için satılan peroksit tabletleri veya sıvı halde ürünler de bulunmaktadır. Derişimi yüksek ise sulandırmak sureti ile seyreltilebilir ve ihtiyaç kadar peroksit elde edilebilir. Bir diğer seçenek **Hidrojen peroksit** (H_2O_2) bazlı çamaşır suları olabilir. Etiketinde sıfır klor çamaşır suyu gibi ifadeler vardır. Etiketlerin üzerini iyi okuyunuz. İçeriğinde “hidrojen peroksit bulundurur” şeklinde bir ifade mutlaka olmalıdır...!.

4- Eczaneden alacağınız iki şırınga (birisi 20-25 ml, değeri 10 ml’lik olursa iyi olur) ile sıvı miktarlarını ölçebilirsiniz. Şırıngalar iğnesiz kullanılacaktır. Büyük olan şırınga ile yalnızca hidrojen peroksit, küçük şırınga ile ciğerden elde edilen sıvıyı ölçmede

kullanacağız. Şırıngaları birbirinin yerine kullanmayınız. Aynı şırınga ile hem ciğer özütü hem de hidrojen peroksitli sıvı ölçümü kesinlikle yapmayınız.

5- Hidrojen peroksit sağlık açısından zararlı olduğu için deneylere başlamadan önce eldiven takınız. Marketlerden alınmış lastik eldiven veya bulaşık eldiveni işimizi fazlasıyla görecektir.

6- Her bir etkinliği yapmadan önce mutlaka birkaç kez deneyin yapılışını okuyunuz. Sizden nelerin isteneceğini iyice anladıktan sonra deneylere başlayınız.

1. ETKİNLİK

Gerekli Malzemeler:

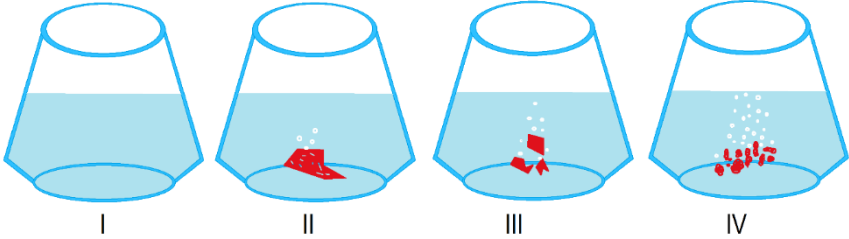
- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- Bardak
- Musluk suyu
- Tavuk karaciğeri
- Şırınga
- Lastik eldiven

Ne Yapıyoruz?

- Dört adet bardak alınız. Her birine 20 ml hidrojen peroksit çözeltisi koyunuz.
- Daha sonra ciğ tavuk ciğerinden küçük küp şeker büyüklüğünde üç parça alınız.
- Birinci bardağa hiç bir şey eklemeyiniz. İkinciye küp şeklinde, üçüncüye küçük doğranmış ve dördüncü

bardağa da iyice ezilmiş tavuk ciğeri koyunuz (Şekil 2).

- Köpürme durumlarını not ediniz.
- Zaman geçtikçe köpürme hızında ne gibi bir değişim meydana geldi? Gözlemleyiniz.



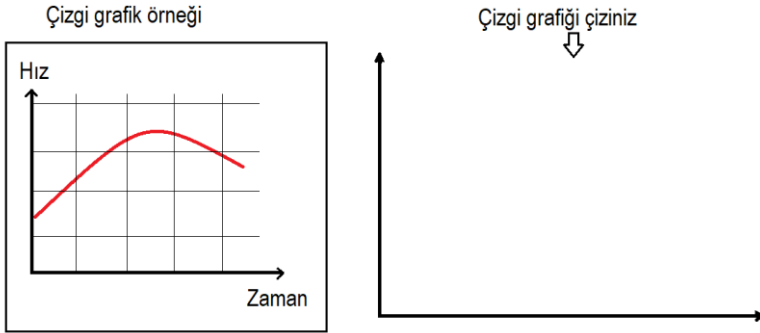
Şekil 2: Enzim yüzeyinin tepkime hızına etkisi

Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

1 - Etkinlik hakkında sorular:

- Bu deneyin amacı nedir?
- Varsa bağımlı ve bağımsız değişkenler nelerdir?
- Deney ve kontrol grubu varsa yazınız?
- Deney sonucunda ne gözlemlediniz?
- Bu deneyde hangi enzim kullanılmıştır?
- Bu deneyin substratı nedir?
- Köpürme hızını ve deneyleri gösteren bir çizgi grafiği şekil 3'te gösteriniz?

(**Köpürme hızı:** En çok, Çok, Orta, Az, En az, Hiç vs. **Deneyler;** I. Bardak, II. Bardak, III. Bardak, IV. Bardak).



Şekil 3: Köpürme hızı ve zamana göre enzim hızını gösteren grafik
Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

Bundan sonraki bütün deneylerde standardı sağlamak için kalan ciğerin tamamını bir blenderden geçiriniz, blender yoksa bir kaptaki iyice ezerek üzerine 100 ml kaynatılıp soğutulmuş su (soğuk) ile karıştırılır. Karıştırma işlemini en az 5 dakika sürdürünüz. Daha sonra bir tülbent bezle süzerek bu suyu deneylerde kullanınız. Tülbent bez yerine süzgeçte kullanılabilir.

2. ETKİNLİK

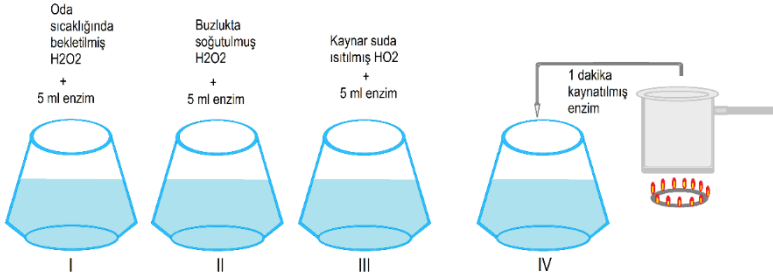
Ne Yapıyoruz?

- Dört adet bardak alınız. Her birine 20 ml hidrojen peroksit çözeltisi koyunuz.
- Birinci bardağa oda sıcaklığında 5 ml ciğer suyu ekleyiniz.
- İkinci bardağı önce buzluğa koyup 20 dakika soğutunuz ve sonra üzerine 5 ml ciğer suyu ekleyiniz.
- Üçüncü bardağı önce içinde kaynar su bulunan kaba koyunuz ve 10 dakika ısıtınız. Bardak ve içindeki

H₂O₂ iyice ısınsın. Sonra üzerine sıcakken 5 ml ciğer suyu ekleyiniz.

- Önce 10 ml ciğer suyunu cezveye koyup kaynatıncaya kadar ısıtınız. 1 dakika kaynattıktan sonra bu numuneden 5 ml alıp dördüncü bardağa ekleyiniz (Şekil 4).

Bütün bardaklardaki köpürme durumlarını not ediniz.



Şekil 4: Sıcaklığın enzim hızına etkisi

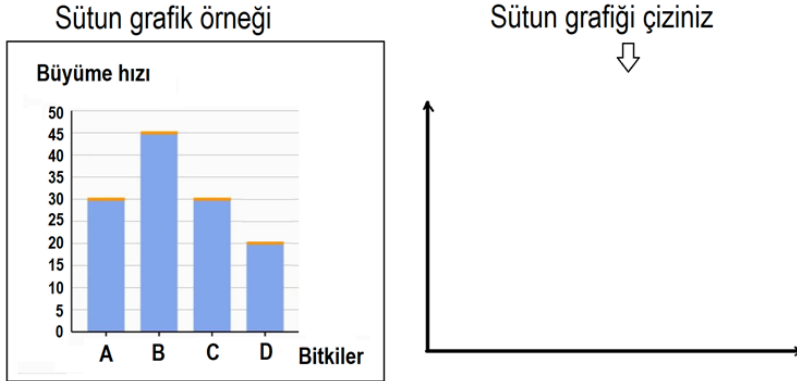
Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

2 - Etkinlik hakkında sorular:

- Bu deneyin amacı nedir?
- Varsa bağımlı ve bağımsız değişkenler nelerdir?
- Deney ve kontrol grubu varsa yazınız?
- Deney sonucunda ne gözlemlediniz? Köpürmeyen bardak var mı? Neden?
- Köpürme oranını en çoktan en aza sıralayınız?
- Şekil 5'i inceleyerek, sırasıyla deneyleri ve köpürme hızını gösteren bir çubuk grafiği çiziniz?

(Köpürme hızı: En çok, Çok, Orta, Az, En az, Hiç.

Deneyler; I. Bardak, II, Bardak, III. Bardak, IV. Bardak).



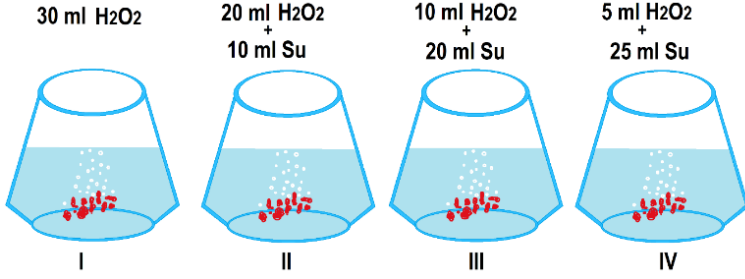
Şekil 5: Sıcaklığın enzim hızına etkisi

Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

3. ETKİNLİK

Ne Yapıyoruz?

- Dört adet bardak alınız. Birinciye 30 ml, ikinciye 20 ml, üçüncüye 10 ml, dördüncüye 5 ml hidrojen peroksit koyunuz.
- Sonra ikinci, üçüncü, dördüncü bardakların üzerini musluk suyu ile 30 ml ye tamamlayınız.
- Daha sonra bütün bardakların üzerlerine ciğer suyundan 5 ml ekleyiniz (Şekil 6).
- Her bir bardaktaki köpürme durumlarını not ediniz.



Şekil 6: Substrat miktarının reaksiyon hızına etkisi

Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

3 - Etkinlik hakkında sorular:

- Bu deney hangi hipotezi test etmek için yapılmaktadır?
- Varsaydığınız hipotezi test etmek için bir tahminde bulununuz?
- Deney ve kontrol grubu varsa yazınız?
- Deney sonuçlarını tablo 1'e işleyiniz?

(Köpürme hızı: En çok, Çok, Orta, Az).

Tablo 1: Substrat miktarının reaksiyon hızına etkisini tabloya işleme

Köpürme hızı H ₂ O ₂ miktarı (ml)				

Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

4. ETKİNLİK

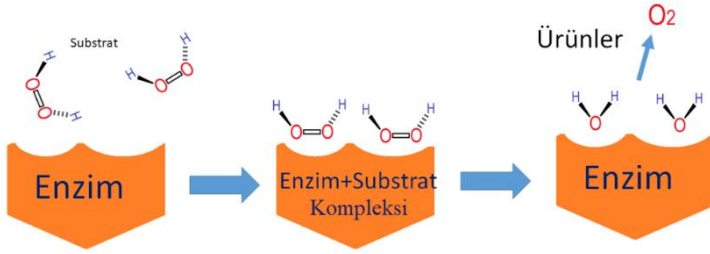
Ne Yapıyoruz?

- Dört adet bardak alınız. Her birisine 30 ml hidrojen peroksit koyunuz.
- Birinciye 30 ml, ikinciye 20 ml, üçüncüye 10 ml, dördüncüye 5 ml sirke koyunuz.
- Sonra ikinci, üçüncü, dördüncü bardakların üzerini musluk suyu ile 60 ml ye tamamlayınız. Her birini iyice karıştırınız.
- Daha sonra bütün bardakların üzerlerine ezilmiş karaciğer suyundan 5 ml ekleyin.
- Her bir bardaktaki köpürme durumlarını not ediniz.

Not: Bu deneyi karbonat, limon tuzu ile de yapabilirsiniz. Bu deneyi katı maddelerle yaparsanız, deneyin yapılışında nasıl bir düzenleme yapmanız gerekir? Tartışınız.

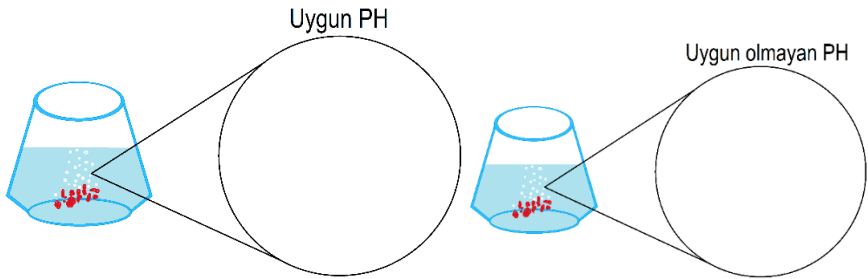
4 - Etkinlik hakkında sorular:

- Bu deneyin amacı nedir?
- Varsa bağımlı ve bağımsız değişkenler nelerdir?
- Kontrol grubu oluşturmak için ne yapmalıyız?
- Deney sonucunda ne gözlemlediniz? Niçin? Tartışınız?
- Şekil 1 ve 7'yi inceleyiniz. Şekil 8'deki dairelerin içine uygun ve uygun olmayan PH'da enzimin yapısının nasıl olacağını moleküler düzeyde çiziniz?



Şekil 7: Moleküler düzeyde enzim ve substratın reaksiyonu

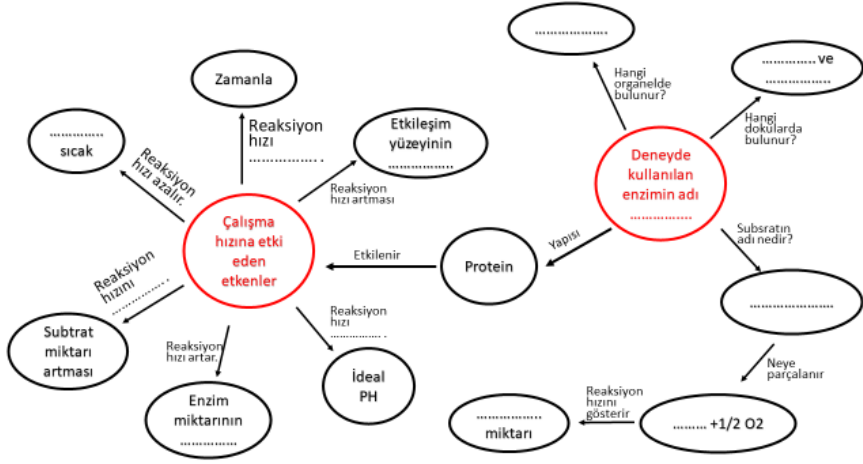
Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ



Şekil 8: PH'ın Enzim üzerine etkisini moleküler düzeyde çizerek gösterme

Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

Şekil 9'daki enzimler ve çalışma hızına etki eden etkenlerle ilgili kavram haritasını doldurunuz.



Şekil 9: Enzimlerle ilgili kavram haritası

Kaynak: SEZEK ve DOYMUŞ

Ödevler

1. Enzim hızının zamanla değiştiğine dair basit bir deney tasarlayınız?
2. Buraya enzim hızına etki eden etkenlerle ilgili kendinize ait orijinal bir soru ve cevabını yazınız.
3. Tamamen kendinize ait bir deney tasarlayınız.

Kaynakça

Abraham, M. R., Williamson, V. M. & Westbrook, S. L. (1994). A cross-age study of the understanding five concepts. *Journal Of Research In Science Teaching*, 31 (2), 147-165.

Adadan, E. (2012). Using multiple representations to promote grade 11 students' scientific understanding of the particle theory of matter. *Research In Science Education*, 43(3), 1079-1105.

Adadan, E., Trundle, K. C. & Irving, K. E. (2010). Exploring grade 11 students' conceptual pathways of the particulate nature of matter in the context of multi representational instruction. *Journal Of Research In Science Teaching*, 47 (8), 1004-1035.

Akgül, G. D., Geçikli, E., Konan, F., & Konan, E. (2018). Fen eğitiminde sanal laboratuvar kullanımı hakkında öğretmen adaylarının görüşleri. *Kesit Akademi Dergisi*, (14), 61-74.

Akkağıt, Ş.F. & Tekin, A.,(2012). Simülasyon tabanlı öğrenmenin ortaöğretim öğrencilerinin temel elektronik ve ölçme dersindeki başarılarına etkisi. *Ege Eğitim Dergisi*, (13) 2: 1– 12.

Aktamış, H., & Ergin, Ö. (2007). Bilimsel süreç becerileri ile bilimsel yaratıcılık arasındaki ilişkinin belirlenmesi. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 33 (33), 11-23.

Al-Holou, N. & Clum, J. A. (1999). *Teaching electrosience using computer- based instruction*, 29. ASEE/ IEEE Frontiers in Education Conference 13c3-24, San Juan, PuertoRico.

Arıkıl, G.,& Kalın, B. (2010). Çözeltiler konusunda üniversite öğrencilerinin sahip olduğu kavram yanılgıları. *Necatibey*

Eğitim Fakültesi Elektronik Fen Ve Matematik Eğitimi Dergisi, 4 (2), 177-206.

Aydoğdu, M., Kesercioğlu, T. (2005). *İlköğretimde Fen Ve Teknoloji Öğretimi*, Ankara: Anı Yayıncılık.

Borgi, L. (1991). Öğretmenlerin bilgisayar kullanımı için eğitimleri. *Doğa - Turkish Journal of Physics*, 15,136-145, Tübitak.

Bozdoğan, A. E., Taşdemir, A., & Demirbaş, M. (2006). The effect of cooperative learning method in science education on improving the students' science process skills. *Inonu University Journal Of The Faculty Of Education*, 7 (11), 23-36.

Çalık, M., Ayas, A. & Ünal, S. (2006). Çözünme kavramıyla ilgili öğrenci kavramalarının tespiti: bir yaşlar arası karşılaştırma çalışması. *Gazi Üniversitesi Türk Eğitim Bilimleri Dergisi*, 4 (3), 309-322.

Çepni, S., Ayas, A., Johnson, D., & Turgut, M. F. (1996). Physic education. *Developing National Education Projects, Pre Service Teacher Training Trial Edition*, 31-44.

Çepni, S. ve Ayvacı, H.Ş. Laboratuvar destekli fen ve teknoloji öğretimi. (2006). S. Çepni (Ed.). *Kuramdan uygulamaya fen ve teknoloji öğretimi* İçinde (S:158-188). Ankara: Pegema Yayıncılık, 5. Baskı.

Çinici, A., Özden, M., Akgün, A., Ekici, M., Et Al. (2013). Sanal ve geleneksel laboratuvar uygulamalarının 5. Sınıf öğrencilerinin ışık ve ses ünitesiyle ilgili başarıları üzerine etkisinin karşılaştırılması. *Bayburt Eğitim Fakültesi Dergisi*, 8 (2), 92-106.

Çinici, A., Özden, M., Akgün, A., Ekici, M., & Yalçın, H. (2013). Sanal ve geleneksel laboratuvar uygulamalarının 5. Sınıf öğrencilerinin ışık ve ses ünitesiyle ilgili başarıları üzerine etkisinin karşılaştırılması. *Bayburt Eğitim Fakültesi Dergisi*, 8(2), 92-106.

Çivril, H. (2018). Açık ve uzaktan öğrenmede laboratuvar uygulamaları. *Yükseköğretim Ve Bilim Dergisi* (1), 41-50.

Cotabish, A., Dailey, D. Ve Hughes, G. D., Robinson, A. (2011). The effects of a stem professional development intervention on elementary teachers' science process skills. *Research In The Schools*, 18(2), 16-25.

Demircioğlu, H., Demircioğlu, G. Ayas, A. & Kongur, S. (2012). Onuncu sınıf öğrencilerinin fiziksel ve kimyasal değişme kavramları ile ilgili teorik ve uygulama bilgilerinin karşılaştırılması. *Türk Fen Eğitimi Dergisi*, 9 (1), 162-181.

Duman, M.Ş. & Avcı, G. (2016). Sanal laboratuvar uygulamalarının öğrenci başarısına ve öğrenilenlerin kalıcılığına etkisi: Mersin-Erdemli örneği. *Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 18 (1), 13-33. <https://doi.org/10.17556/jef.08804>

Duru, M. K., Demir, S., Fatma, Ö. N. E. N., & Benzer, E. (2011). Sorgulamaya dayalı laboratuvar uygulamalarının öğretmen adaylarının laboratuvar algısına tutumuna ve bilimsel süreç becerilerine etkisi. *Marmara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Dergisi*, 33 (33), 25-44.

Franco, A.G. & Taber, K.S. (2009). Secondary students' thinking about familiar phenomena: learners' explanations from a curriculum context where 'particles' is a key idea for organizing

teaching and learning. *International Journal Of Science Education*, 31 (14), 1917-1952.

Haigh, M., France, B., &Gounder, R. (2012). Compounding confusion? When illustrati and practical work falls short of its purpose- A case study. *Research In Science Education*, 42, 967-984.

Harlen, W. (1999). Purposes and procedures for assessing science process skills. Assessment in education: principles. *Policy & Practice*, 6(1), 129-144.

Huppert, J.,Lomask S. M. Ve Lazarorcitz, R. (2002). Computer simulations in the high school: students' cognitive stages, science process skills and academic achievement in microbiology. *International Journal Of Science Education*, 24 (8), 803-821.

Kaya, E. (2017). Biyoloji öğretmen adaylarının “enzim” konusundaki bilişsel yapıları (Erzurum örneği). *Ekev Akademi Dergisi*, 72, 87-108.

Korkmaz, H., Kaptan, F. (2001). Fen eğitiminde proje tabanlı öğrenme yaklaşımı. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 20, 193.

Köse, S., Ayas, A., & Taş, E. (2003). Bilgisayar destekli öğretimin. *Pamukkale Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 14 (14), 106-112.

Linenberger, K. J., And Bretz, S. L. (2012). Generating cognitive dissonance ın student interviews through multiple representations. *Chemistry Education Research And Practice*, 13 (3), 172–178.

Macaroğlu, E. (1995). İlköğretim kurumlarında fen bilgisi programlarının etkinliği (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi), Marmara Üniversitesi, Sosyal Bil. Ens., İstanbul.

Monhardt, L., & Monhardt, R. (2006). Creating a context for the learning of science process skills through picture books. *Early Childhood Education Journal*, 34, 67-71.

Mırçak, Karagöz, Ö. & Saka, A.Z. (2016). Fizik öğretiminde sanal laboratuvar destekli uygulamaların değerlendirilmesi. *Eğitim ve Öğretim Araştırmaları Dergisi*, 5, 388-395.

Muşlu Kaygısız, G. Benzer, E. Uçar, M (2017). Fen bilgisi öğretmen adaylarının bilimsel süreç becerilerine dayalı deney tasarımlarının değerlendirilmesi. *Sakarya University Journal of Education*, 7 (3), 467-483.

Pektaş, H. M., Çelik, H., Katrancı, M., & Köse, S. (2009). 5. Sınıflarda ses ve ışık ünitesinin öğretiminde bilgisayar destekli öğretimin öğrenci başarısına etkisi. *Kastamonu Eğitim Dergisi*, 17 (2), 649-658.

Rowland, P., Stuessy, C. L. Ve Vick, L. (1987). Basic Science Process Skills: An Inservice Workshop Kit. [Workshop Manual]. Retrieved From Eric Database. (Ed282773)

Smith, K. C., & Villarreal, S. (2015). Using animations in identifying general chemistry students' misconceptions and evaluating their knowledge transfer relating to particle position in physical changes. *Chemistry Education Research And Practice*, 16 (2), 273-282.

Sinan, O. (2007). Fen bilgisi öğretmen adaylarının enzimlerle ilgili kavramsal anlama düzeyleri. *Necatibey Eğitim Fakültesi Elektronik Fen Ve Matematik Eğitimi Dergisi*, 1(1), 1-22.

Sinan, O., Yıldırım, O., Kocakulah, M. S. Ve Aydın, H. (2006). Fen bilgisi öğretmen adaylarının proteinler, enzimler ve protein sentezi ile ilgili kavram yanılgıları. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 26(1), 1-16.

Okumuş, S., Çavdar, O., Alyar, M., Doymuş, K. (2017). Kimyasal denge konusunun mikro boyutta anlaşılmasına farklı öğretim yöntemlerinin etkisi. *İlköğretim Online*, 16(2), 727-745. <https://doi.org/10.17051/ilkonline.2017.304730>

Okumuş, S., Öztürk, B., Doymuş, K., Alyar, M. (2014). Maddenin tanecikli yapısının mikro ve makro boyutta anlaşılmasının sağlanması. *Eğitim Bilimleri Araştırmaları Dergisi*, 4 (1), 349-368.

Özmen, H. (2011). Turkish primary students' conceptions about the particulate nature of matter. *International Journal Of Environmental & Science Education*, 6 (1), 99-121.

Üstüner, I.Ş., Sancar, M. (1999). “Lise öğrencilerinin fizik kavramlarını anlama düzeylerini ve tutumlarını etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi”. *D.E.Ü. Buca Eğitim Fakültesi Dergisi Özel Sayı*, 11,147-155.

Talanquer, V. (2011). Macro, submicro, andsymbolic: the many faces of the chemistry “triplet”. *International Journal Of Science Education*, 33 (2), 179-195.

Taşçı, G. Ve Soylu, M. (2015). Sınıf öğretmenlerinin fen öğretim programına yönelik görüşlerinin biyoloji konuları

bakımından değerdendirilmesi: Erzincan 6rneği. *Erzincan  . E.F.Dergisi*, 17 (1), 55-72.

Temiz, B. K.,& Tan, M. (2003). İlk6đretim fen 6đretiminde temel bilimsel süreç becerileri. *Eğitim Ve Bilim*, 28 (127), 18-24.

Türk, S. (2010). İlk6đretim fen bilgisi 6đretmenlerinin laboratuvar yeterliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Wilson, J.M. &Redish, E. F. (1989). Using computers in teaching physics, *Phys. Today* 42, 34-41.

BÖLÜM II

Kirlenmiş Alanlarda Biyoremediasyon Ajanları (Algler ve Mantarlar)

Nezahat KANDEMİR¹

Giriş

Hem dünyada hem de ülkemizde artan nüfusun enerji ve besin ihtiyaçlarının karşılamak için tarım alanlarında (özellikle pestisitler) ve endüstriyel üretimde yoğun bir şekilde kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu maddeler çevre kirliliğine neden olarak canlıların sağlığını ve yaşam ortamlarını bozmaktadır. Bozulan doğal dengenin yeniden kurulması, toprak ve su kaynaklarının temizlenmesi için bazı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. İşte çevreyi iyileştiren, çevre dostu olan, hem de ekonomik olan bu yöntemlerden birisi biyoremediasyon yöntemidir. Bu yöntemde kirlletici maddeler biyolojik aktivitelerle karbondioksit ve su gibi zararsız son ürünlere dönüştürülmektedir.

¹ Prof. Dr., Amasya Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi, Amasya/Türkiye, Orcid: 0000-0002-5428-4139, nezahatkndmr@gmail.com

Canlıların yaşam ortamları, klorlu uçucu organik bileşikler, alkil benzen (benzen, toluen, etil benzen ve ksilenler, BTEX), hidrokarbonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, poliklorlubifeniller (PCB) ve trikloroetilen, tanklardan veya dolum boşaltım esnasında tankerlerden sızan maddeler, patlama sonucu petrol saçılması ve atık petrol ürünlerinin oluşması gibi endüstriyel faaliyetlerle yoğun olarak kirlenmektedir (Adeniyi & Afolabi, 2002).

Modern tarım uygulamalarında verim arttırmak için yoğun ve bilinçsiz bir şekilde pestisitler kullanılmaktadır. Kullanılan pestisitlerde toprak, su ve hava da aşırı miktarlarda birikerek canlı çevrede büyük problemlere yol açmaktadır. İşte pestisitlerin kirl ettikleri ortamlardan uzaklaştırılmasında biyoremediasyon uygulamaları günümüzde önem kazanmaktadır. Pestisitler tarım alanlarına zarar veren böcekler, mantarlar, fareler ve diğer bazı hayvanlar, yabancı otlar ve mikroorganizmalara karşı kullanılan maddelerdir. Dünyada ve ülkemizde toprak ve suda birikmiş olan pestisitlerin zararlarını azaltmak veya yok etmek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik yöntemlerden olan biyolojik remediasyon (biyoremediasyon) canlılar için tehlikeli olan maddeleri zararsız duruma dönüştürmek için çeşitli canlıların kullanıldığı uygulamalardır.

Geleneksel remediasyon yöntemlerinin; seçiciliklerinin düşük olması, tamamen kirl etici giderimi yapmamaları, fazla enerji harcamaları, zehir etkisi oluşturmaları ve maliyetlerinin yüksek olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Oysa biyoremediasyon yöntemleri, çevreyi ve canlıları koruyan giderim teknolojilerindendir. Biyoremediasyon teknikleri ile başarılı ve etkin yapılan araştırmalar pestisitle kirl etilmiş ortamların iyileştirilmesinde biyoremediasyon

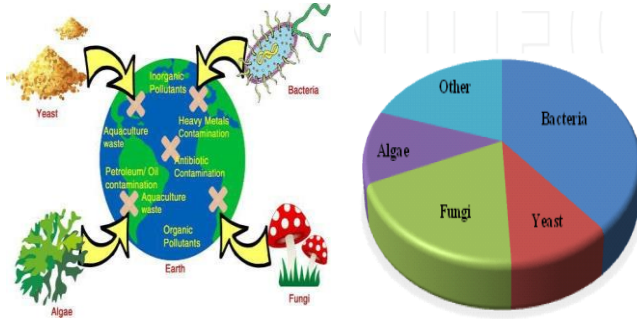
yöntemlerinin başarılı bir şekilde kullanılacağını göstermiştir (Gül &Yavuz, 2018).

1. Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme)

Çevredeki kirleticilerin bazı mikroorganizma ve makroorganizmalar yoluyla temizlenmesi işlemidir. Biyoremediasyon, doğaya ve canlılara zarar veren çeşitli kirleticilerin zararsız ürünlere dönüştürülmesinde bazı canlıların kullanıldığı, çevre dostu ve sürdürülebilir olan, uygun maliyetli, fazla çaba gerektirmeyen, tehlikeli kimyasal maddelerin kullanılmadığı ve kirleticilerin tamamen yok edildiği etkili bir yöntemdir (Deshmukh, Khardenavis & Purohit, 2016). Bu yöntemde kirletilmiş olan yaşam ortamlarının temizlenmesinde yaygın olarak kullanılan canlılar; bakteriler, mayalar, algler, mantarlar ve diğer canlılardır (Şekil 1 ve 2; URL 1 ve Coelho &ark., 2015). Kirletilmiş alanlarda uygun canlılar kullanılarak çeşitli kimyasal ve fiziksel reaksiyonların gerçekleşmesi sağlanır ve sonunda kirletici maddelerin parçalanıp yok edilmesi ile ortam temizlenir (Gillespie & Philip, 2013). Kullanılan metodun etkili olabilmesi için, kullanılan canlının yeterli miktarlarda bulunması, kirletici maddelerle yakın temas içerisinde olması, yok edilecek maddelere enzimatik olarak saldırması ve zararsız ürünlere dönüştürmeleri gerekmektedir (Dindar, Topaç Şağban & Başkaya, 2010). Ayrıca ortamda sıcaklık, besin elementleri, pH ve elektron alıcılar gibi çevresel faktörlerinde uygun olmasına dikkat edilmelidir.

Biyoteknolojik iyileştirme yöntemleri içerisinde bulunan biyoremediasyonun geleneksel yöntemlere göre daha fazla avantajları bulunmaktadır (Chowdhury, Bala & Dhauria, 2012). Radyoaktif maddeler, fenoller, patlayıcı maddeler, petrolden türetilen organik

maddeler, ağır metaller ve toksik organik kirleticiler biyoremediasyon yöntemi ile yok edilebilen kirleticiler arasında yer almaktadır.



Şekil 1 ve 2: Biyoremediasyon uygulamalarında kullanılan organizmalar

Kaynak: URL 1 ve Coelho &ark., 2015

1.1. Biyoremediasyonun Avantajları; 1. Bakımı ve uygulaması kolay bir biyo-giderim yöntemidir 2. Düşük maliyetlidir 3. Estetik açıdan hoş ve çevre dostudur 4. Çöp depolama alanlarındaki atıkların miktarını azaltmaktadır 5. Çeşitli organik ve inorganik bileşikler için uygundur 6. Alan ya da alan dışında yapılabilir (Chowdhury, Bala & Dhauria, 2012).

1.2. Biyoremediasyonun Dezavantajları; 1. Biyolojik süreçlerin spesifik olması 2. Biyolojik olarak parçalanacak olan bileşiklerin sınırlı olması 3. Kriterlere yönelik yasal belirsizliklerin bulunması 4. Uygulama sürecinin uzun sürmesi 5. Kirleticilerin katı, sıvı ve gaz gibi farklı olması 6. İklim koşullarına bağlılığının bulunması (Chowdhury, Bala & Dhauria, 2012).

Biyoremediasyon uygulamalarında biyolojik, kimyasal ve hidrolojik faktörler etkili olmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1: Biyoremediasyon sürecinde etkili olan faktörler

Uygun olan biyolojik ve kimyasal faktörler	Uygun olmayan biyolojik ve kimyasal faktörler
Az sayıda organik kirlilik	Birçok organik ve inorganik kirleticilerin karışımı
Uygun pH aralığı	Uygun olmayan pH aralığı
Mikroorganizmaların çeşitliliği	Düşük mikrobiyal popülasyon
Oksidasyon için uygun elektron alıcı	Oksidasyon için elektron alıcısı yokluğu
Aşırı toksik olmayan kirleticiler	Toksik kirleticiler

Uygun olan hidrolojik faktörler	Uygun olmayan hidrolojik faktörler
Granüler boşluklu alan	Kırık kayalar
Uniform mineraloji	Kompleks mineraloji
Doyurulmuş tabaka	Doyurulmamış tabaka
Yüksek permeabilite (10-4 cm/s)	Düşük permeabilite
Homojen alan	Heterojen alan

Kaynak: Dindar, Topaç Şağban & Başkaya, 2010

2. Biyoremediasyonda Kullanılan Teknikler

2.1 In-situ (Yerinde) Biyoremediasyon Teknikleri: Bu teknikte atıkların bulunduğu alanlara besin aktarımı yapılarak ortamda bulunan mikroorganizmaların aktif duruma geçmesi sağlanır. Sıkı toprak yapısına sahip olan alanların temizlenmesinde çok etkilidir. Özellikle bu alanlarda bulunan yarı uçucu organiklerin, dizel yakıtların

ve halojen olmayan yarı uçucu maddelerin arıtılması için uygulanmaktadır (Dindar, Topaç Şağban & Başkaya, 2010). Bu biyoremediasyon tekniğinin en önemli avantajı düşük maliyetli olmasıdır.

2.2. Ex-situ (Uzaktan veya Yerinde Yapılmayan)

Bioremediasyon Teknikleri: Bu teknikte kirlenmiş olan toprak ve su başka yerlere taşınarak ortama kirleticileri parçalayabilecek mikroorganizmalar ilave edilmektedir. Diğer taraftan ortamda inorganik besin maddeleri (özellikle fosfor ve azot), pH, sıcaklık ve elektron alıcılar (sülfat, oksijen ve nitrat) gibi faktörler uygun hale getirilmesi gerekmektedir. Bu durum ekonomik açıdan bu tekniğin uygulanmasında dezavantaj oluşturmaktadır. Bu teknik topraktaki hidrokarbonların uzaklaştırılmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Diplock & ark., 2009). Ex-situ teknikler, çabuk sonuç alınmasının gerekli olduğu ve yoğun bir şekilde kirlenmiş toprakların arıtılmasında/temizlenmesinde çok tercih edilmektedir.

2.3. Kombine Biyoremediasyon Tekniği: Radyoaktif atıklar, tehlikeli atık alanlar, hastane atıkları ve arıtım çamurlarının boşaltıldığı alanların temizlenmesinde önerilen tekniktir. Böyle alanlar çok tehlikeli ve karmaşık bileşikler içerdiğinden ancak kombine biyoremediasyon tekniği ile temizlenmektedir (Ceyhan & Esmeray, 2012).

Bu çalışmada, literatürde hem dünya hem de ülkemizde biyoremediasyon yönteminde kullanılan mikroalgler, siyanobakteriler ve mantarlar ilgili biyoremediasyon çalışmalarına yer verilmiştir.

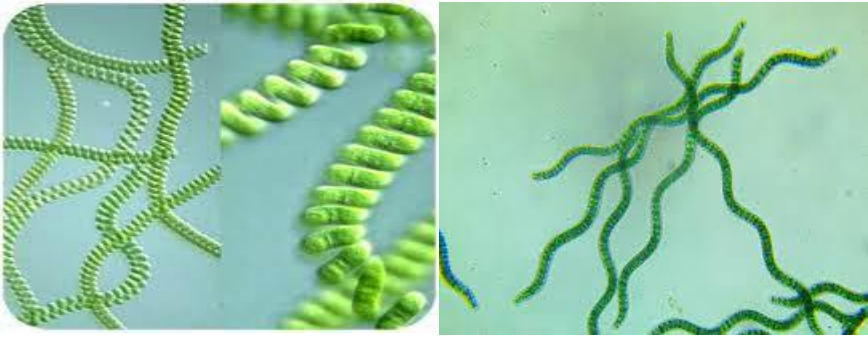
3. Biyoremediasyon Uygulamalarında Kullanılan Canlılar

3.1. Biyoremediasyon ve Algler (Mikroalgler ve Siyanobakteriler)

Mikroalgler hem tatlısu hemde deniz ekosistemlerinde mikroskobik fotosentetik canlılar olup dünyada en büyük üretici grubunu oluşturmaktadırlar. İçermiş oldukları pigmentlerden dolayı kozmetik ürünlerinde, tıp ve eczacılıkta katkı maddesi olarak, zengin protein içeriklerinden dolayı da gelişmekte olan ülkelerde insan ve hayvan besini olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Ayrıca tarım alanlarında organik gübre olarak da tercih edilmektedirler (Demirel & ark., 2018). Bu canlıların biyoremediasyonda kullanılmasının iki önemli sebebi bulunmaktadır. Birincisi, fotosentez sonucunda bol oksijen üretmeleri ve oksijence fakir olan atıksu ortamlarının oksijenlenmesine katkı sağlamalarıdır. İkincisi, fosfor ve azot bakımından zengin olan deniz ve iç sularda aşırı derecelerde çoğalabilmeleridir (Şişman Aydın & Oral, 2014). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, mikroalglerin atıksuların arıtılmasında, pestisitleri, organik ve inorganik maddeleri, ağır metalleri ve nütrientleri uzaklaştırmada oldukça başarılı oldukları görülmüştür (Şişman Aydın, 2018).

Siyanobakterilerde (mavi-yeşil algler) ihtiyaç duydukları enerjiyi fotosentez yolu ile elde eden canlılardır. Mavi-yeşil alglerden olan *Spirulina* cinsi tümör büyümesinde, toksik etkisi olmayan viral ataklarda, anemi ve malnütrisyonda etkin bir şekilde gıda olarak kullanılmaktadır (Zhou & ark., 2018). Bundan dolayı *Spirulina* cinsi Meksika ve Afrika da insanların geleneksel yemekleri arasında yer almaktadır. *Spirulina maxima* ve *Spirulina platensis* en önemli türleridir (Şekil 3, URL 2; Şekil 4, URL 3). *Spirulina* türleri yüksek oranda aminoasit (% 62,0), karoten ve ksantofil içerir ve dünyanın en

zengin doğal B12 vitamini kaynağıdır. Ayrıca az miktarlarda bile *Spirulina*'nın bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkiler yaptığı da görülmüştür (Soni, Sudhakar & Rana, 2017). *Spirulina platensis* gıda olarak kullanılmasının yanında ortamdaki ağır metallerin temizlenmesinde de kullanılabileceği yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır (Thengodkar & Sivakami, 2010). Diğer taraftan hem mikroalgler hem de siyanobakteriler, binlerce yıldır ilaç, gıda ve su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisi için yüksek değerli bileşiklerin doğal bir kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3: *Spirulina platensis* Şekil 4: *Spirulina maxima*

Kaynak: URL2Kaynak: URL3

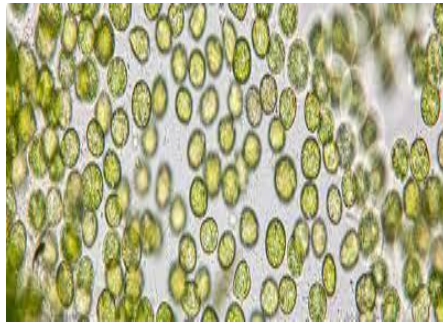
Endüstriyel atık sular hem çevreye hem de canlılara zarar verecek çeşitli inorganik (Cd-kadmiyum, Cr-krom, As-arsenik, Pb-kurşun ve Hg-civa gibi toksik ağır metalleri) ve organik (fenoller, klorlu fenoller, endokrin bozucu kimyasallar, azo boyalar, poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller, pestisitleri) kirletici maddeleri taşımaktadır (Bharagava, Saxena & Mulla, 2020). Bunun için bu atık suların çevreye ve canlılara zarar vermeyecek biyo-giderim yöntemleri ile bir an önce bulundukları ortamlardan uzaklaştırılmaları gerekmektedir.

Biyoremediasyon işlemlerinde mikroorganizma seçimi oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, yüksek uyum yeteneğine sahip olan ve değişik çevre şartlarını (yüksek sıcaklık, farklı basınç ve yüksek tuz konsantrasyonları) tolere edebilen ekstremofil mikroorganizmalar biyoremediasyon süreçlerinde son yıllarda daha fazla tercih edilmektedir. Boya çeşitlerinden bazıları; sülfür boyalar, azo boyalar, reaktif boyalar, bazik boyalar, asit boyalar, metal boyalar, indigo boyalar, metalik boyalar, solvent boyalar, dispers boyalar, direkt boyalar, antrokinon boyalar, azoik boyalar, doğal boyalar ve pigmentler gibidir. Tekstil endüstrilerinin ürettiği büyük miktardaki sulu atık içeren boyalar ciddi bir çevre sorunu oluşturmaktadır. Literatürde, tekstil atıksularının ve farklı boyaların temizlenmesinde/giderilmesinde kullanılan farklı mikroalg ve siyanobakterilerle yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Zhou & ark., 2014; Bela & Malliga, 2015; Ghazal & ark., 2016; Abou-El-Souod & El-Sheekh, 2016; Dellamatrice & ark., 2017; İsmail & ark., 2020). Şöyleki;

Omar (2008) tartrazine ve ponceau boyalarının farklı mikroalg ve siyanobakteri ile temizlenmesini incelemiştir. Araştırmada, *Chlorella vulgaris* (Şekil 5, URL 4), *C. ellipsidea* ve *C. kessui* mikroalglerini, *Oscillatoria angusta*, *Anabaena laxa*, *A. subcylindrica*, *Scenedesmus obliquus* ve *S. bijugates* siyanobakterileri kullanılmıştır. Hem mikroalg hem de siyanobakteriler için en iyi temizleme işleminin 5 mg/L boya konsantrasyonunda meydana geldiği saptamıştır.

El-Sheekh & ark. (2009) bazı boyaların (methyl red, basic cationic, g-red, basic fuschin, orange II) ortamdan temizlenmesinde *Nostoc linckia*, *C. vulgaris*, *Oscillatoria rubescens*, *Volvox aureus*, *Lyngbya lagerlerimi* ve *Etkatothrix viridis* gibi bazı mikroalg ve siyanobakterileri kullanmışlardır. Basic cationic boyası araştırmada

kullanılan bütün canlılar tarafından uzaklaştırılırken, orange II boyası *V. aureus* ve *E. viridis* haricinde diğer mikroorganizmalar tarafından sadece %25 oranında ancak ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. *C. vulgaris* basic fuschin boyasını en yüksek oranda (%94,85) ortamdan uzaklaştırmayı başarmıştır. Methyl red ise *O. rubescens* ve *N. linckia* tarafından sırasıyla %81,97 ve % 81,3 verimle ortamda biyogiderim işlemi gerçekleştirilmiştir. G-red boyasının giderimi ise en yüksek oranda (%59,11) *C. vulgaris* sayesinde sağlanmıştır.



Şekil 5: *Chlorella vulgaris*

Kaynak: URL 4

Diğer bir araştırma Karacakaya & ark. (2009) tarafından yapılmıştır. Araştırmada reactive black B, remazol blue ve reactive red boyalarının giderilmesinde *Synechosystis* sp. ve *Phormidium* sp. cinslerine ait olan türler kullanılmıştır. Kullanılan bu siyanobakteriler sırasıyla reactive black B boyasını %28,3 ve %29,2, remazol blue boyasını %25,5 ve %37,5 ve reactive red boyasını ise %35,4 ve %25,7 oranında ortamdan uzaklaştırmışlardır.

Coelastrella sp. mikroalgi ile rhodamine B boyasının 100, 200, 300, 400 ve 500 mg/L konsantrasyonlarının ortamdan biygiderimi üzerine bir araştırma yapılmıştır (Baldev & ark., 2013). 100 mg/L boya

konsantrasyonunda %60 ile en yüksek boya gideriminin olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada %10 biyokütle miktarında %70'lik bir giderim gerçekleştiğı saptanmıştır. Farklı pH (3-9) ve sıcaklık (20-60 °C) denemelerinde ise en yüksek biyo-giderim pH 8'de, sıcaklıkta ise 30 °C' de gözlenmiştir.

Boduroğlu, Kılıç & Dönmez (2013), remazol blue boyasının biyoremediasyonunda *Gonium* sp. türlerini kullanmıştır. 0,21 g/L ve 0,32 g/L biyokütle içeren ortamda boya gideriminin sırasıyla %79,5 ve % 85 oranında yapıldığı bulunmuştur.

El-Kassas & Mohamed (2014) Mısır'daki farklı bölgelerden alınan tekstil atık sularındaki bazı boyaların (baskın renkler mavi ve kırmızı) temizlenmesinde *C. vulgaris* türünü kullanmıştır. Sıcaklığın 25°C ve atıksu konsantrasyonunu %5 ve %30 olduğu koşullarda biyo-giderim sırasıyla %78,07 ve %74,66 olarak belirlenmiştir.

Scenedesmus quadricauda ABU12 mikroalgi indigo blue boyasının biyo-gideriminde kullanılmıştır (Chia, Odoh & Ladan, 2014). Biyokütle artıkça boyanın daha verimli bir şekilde ortamdan temizlendiğı görülmüştür.

C. vulgaris ile ilgili başka bir araştırma kongo red boyasının ortamdan temizlenmesi Hernández-Zamora & ark. (2015) tarafından yapılmış ve bu çalışmada sıcaklık 25°C ve boya konsantrasyonları ise 5, 10, 15, 20 ve 25 mg/L olarak belirlenmiştir. Congo red boyasının ortamdan biyo-gideriminin en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru sırasıyla %83, %81, %75, %72 ve %58 oranlarında olduğu belirlenmiştir. Yani en yüksek giderim (%83) 5 mg/L boya konsantrasyonunda gerçekleştiğı bildirilmiştir.

Bela & Malliga (2015) atık sulardaki tekstil boyasının biyogideriminde deniz siyanobakterisi *Lyngbya* sp. cincine ait türleri kullanmış ve farklı tarımsal atıkların (şeker kamışı çöpü, mısır atığı, muz gövdesi lifi ve yer fıstığı kabuğu gibi) siyanobakterilerin büyümesi üzerindeki etkisini incelemiştir. Çalışma sonucunda *Lyngbya* sp. türlerinde boya gideriminin %74,48 oranında ve en iyi gelişmenin de yer fıstığı kabuğu ilave edilen ortamda olduğu tespit edilmiştir.

Brahmbhatt & Jasrai (2016) tekstil endüstrisi atıksularında bulunan mavi ve kırmızı renk boyaların temizlenmesinde *Oscillatoria* sp. ve *Spirogyra* sp. cinslerini kullanmıştır. Çalışmadaki pH değerleri olarak 4, 6, 8 ve 10, biyokütle olarak %1, %2 ve %3 konsantrasyonları seçilmiştir. En yüksek biyo-giderimin pH 10 ve %3 biyokütlede meydana geldiği tespit edilmiştir. Kırmızı boyada pH 10 da *Oscillatoria* sp. %62,63 ve *Spirogyra* sp. ise %64,21 değerinde bir giderim gerçekleştirirken, mavi boya için *Oscillatoria* sp. %76,48 ve *Spirogyra* ise %78,29 oranında bir biyogiderim yapabilmıştır. %3'lük biyokütlede mavi boya içeren ortamda *Oscillatoria* sp. %74,3, *Spirogyra* sp. %78,28 ve aynı biyokütlede kırmızı boya içeren ortamda *Oscillatoria* sp. %59,73, *Spirogyra* sp. %63,68 verimle çalıştıkları rapor edilmiştir.

Abou-El-Souod ve El-Sheekh (2016) yaptıkları bir çalışmada, bazik fuksin ve metil kırmızısı boyalarının *Hydrocoleum oligotrichum* ve *Oscillatoria limnetica* tarafından biyolojik parçalanmasını araştırmıştır. 7 gün sonra bazik fuksin'in *H. oligotrichum* ve *O. limnetica* tarafından bozunmasının sırasıyla %92,44 ve %90,23 olduğu bulunmuştur. Diğer yandan metil kırmızısı'nın *H. oligotrichum* ve *O. limnetica* tarafından 7 gün sonra parçalanması sırasıyla %53,23 ve

%50,18 oranlarında olmuştur. Bu boyaların algler tarafından bozunması, bileşiğin moleküler yapıları ve alglerin fizyolojik metabolizması ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Başka bir boya giderim çalışması *Phormidium* sp., *Synechoccus* sp. ve *Anabaena* sp. cinslerine ait siyanobakteriler ile yapılmıştır (Dellamatrice & ark., 2017). Bu çalışmada çamur, atıksular, indigo, sulphur black ve remazol brilliant blue R sentetik boyaları kullanılmıştır. *Phormidium* sp.ve *Anabaena* sp. boya içeren atıksudan sırasıyla %28,37 ve %23,87 oranında boyayı temizlerken, indigo boyasını ise sırasıyla %91,22 ve %71,92 oranında temizlemişlerdir. Çamur ve remazol brilliant blue boyasının biyo-gideriminin üç siyanobakteri tarafından da yapılamadığı belirlenmiştir. Diğer yandan *Synechoccus* sp. siyanobakterisi remazol brilliant blue R boyasını (%11,53) ve atıksuyu (%1,29) ortamdan çok az oranlarda uzaklaştırmasına rağmen, çamur, indigo ve sulphur black boyalarını hiç uzaklaştıramadığı saptanmıştır.

Biyouki & ark. (2018) *C. vulgaris* mikroalgini ortamda bulunan Tectilon Yellow 2G boyasını temizleme işleminde kullanmış ve alkali pH değerlerinde bu türün boya giderim yeteneğinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Oyebamiji & ark. (2019) Nijerya'nın üç farklı bölgesinden aldıkları atıksulardan boyaların giderimi ile ilgili denemeler yapmışlardır. Denemelerde beş *Chlorella* türü ve bir tanede *Micractinium* türü kullanılmıştır. Boya giderim veriminin *Chlorella* sp. KU211b için %47,10, *C. sorokiniana* UTEX 246 için ise %70,03 olduğu saptanmıştır.

Başka bir araştırmada, termotolerant *Chlorella vulgaris* mikroalgi ve termofil *Cyanobacterium aponinum* siyanobakterisinin etkin bir şekilde brilliant blue R (BBR) ve remazol brilliant blue R (RBBR) boyalarını içeren atıksuların biyo-giderim kapasiteleri incelenmiştir (Erkoç, 2020). Farklı boya (10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L ve 60 mg/L), sıcaklık (25 °C, 35 °C ve 45 °C), pH (pH 6.5, 7.5, 8.5 ve 9.5), ve biyokütle (%10 ve %20) konsantrasyonlarında denemeler yapılmıştır. *C. vulgaris* türü biyokütle konsantrasyonu %10'dan %20'ye çıkarıldığında daha yüksek oranda boyayı uzaklaştırdığı tespit edilmiştir. Özellikle *C. aponinum* siyanobakterisinin yüksek boya konsantrasyonu, yüksek pH ve sıcaklık gibi birden fazla stres koşullarına dayanabildiği ve diğer boya giderim çalışmalarında kullanılan siyanobakterilere oranla daha yüksek miktarlarda biyo-giderim gerçekleştirdiği belirlenmiştir. *C. aponinum* türü bu özellikleri ile boya içeren atıksuların biyoremediasyonu için önemli bir aday konumunda olacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Çevredeki pestisit kirliliği, insanlar, su ve kara yaşamı için gerçek bir tehlike oluşturmaktadır. Kontrol edilmediği takdirde pestisit kirliliği çevrede ciddi sorunlara yol açabilir. Pestisit kirliliği, otomatik tarım uygulamalarının yaygın kullanımının bir sonucu olarak uçaklardan ve hatta dronlardan havadan püskürtme ve bunların tedbirsizce doğrudan su kütlelerine taşınması gibi düzenlenmemiş uygulama yöntemleriyle daha da kötüleşmektedir. Ayrıca pestisitlerin tarım arazisine doğrudan uygulanması, yaprak sprey sürüklenmesi, yüzey akışı, tarımsal erozyon ve pestisit üreten endüstrilerden yetersiz arıtılmış ve/veya arıtılmamış atık suyun boşaltılması yoluyla sucul ekosistemlere karışmaktadır. Bu kirliliğin düşük seviyede tutulabilmesi için sürdürülebilir ve uygun maliyetli alternatif yöntemlere ihtiyaç

duyulmaktadır (Bhat & ark., 2020). Biyolojik iyileştirme teknikleri, ortamdaki pestisit kalıntılarını ortadan kaldırmak için bazı canlıları kullanan güvenilir ve etkili yöntemlerdendir. Aynı zamanda mikroalgler ve siyanobakteriler bazı pestisitlerin ortamdan temizlenmesinde de yoğun bir şekilde kullanılmışlardır.

Organofosforlu bir pestisit olan fenamifos'un beş yeşil alg ve beş siyanobakterinin farklı türleri tarafından parçalanması araştırılmıştır (Caceres, Megharaj & Naidu, 2008). Araştırmada kullanılan alglerin ve siyanobakterilerin fenamifos pestisitini parçalayabildiği rapor edilmiştir. Ayrıca bu alglerin ve siyanobakterilerin pestisitlerin ve toksik metabolitlerinin biyoremediasyonunda kullanılabileceği ileriye sürülmüştür.

Pestisitlerden Imidaklorid (insektisit çeşidi) ve Knockdown 48 SL (herbisit çeşidi) içeren atık suların arıtılmasında *Synechocystis* sp. ve *Phormidium* sp. cinslerine ait olan türlerin biyoremediasyon kapasiteleri araştırılmıştır (Aminfarzaneh, 2010). Çalışmanın sonucunda, *Synechocystis* sp. imidaklorid, Knockdown 48 SL ve triakontanol hormonu içeren kültür ortamında en yüksek biyokütle artışı ve % imidaklorid pestisitini biyogiderim yaptığı belirlenmiştir. *Phormidium* sp. ise sadece Imidaklorid pestisitini içeren ortamda en yüksek popülasyon büyümesi ve giderim yeteneği göstermiştir.

Diğer yandan, siyanobakteri türlerinden olan *Microcystis novaceki* %90,0'dan daha fazla miktarlarda metil parathionu biyoremedide edebildiği saptanmıştır (Fioravante & ark.,2010).

Yeşil mikroalg *C. vulgaris* tarafından pek çok alanda yaygın olarak kullanılan bir pestisit çeşidi olan diazinonun %98,0 oranında temizlendiği bildirilmiştir (Kurade & ark., 2016).

Başka bir araştırmada *C. vulgaris* ve *S. platensis*'in atık sularda bulunan malathionu %99,0 oranında biyogiderim yaptıkları bulunmuştur (Abdel-Razek & ark., 2019).

İsmail & ark. (2020) iki siyanobakteri türü olan *Anabaena variabilis* ve *Spirulina platensis* kullanılarak gümüş nanopartiküllerinin biyosentezi araştırılmış ve boya giderme kapasitesi açısından değerlendirilmiştir. Araştırmanın sonuçları incelendiğinde, artan gümüş nanopartiküllerinin konsantrasyonunun, *S. platensis* ve *A. variabilis* sırasıyla %88 ve %81'e kadar bir verimlilikle malahit yeşili boyasını biyo-giderim yaptıkları görülmüştür.

Gül (2021) tarafından *S. platensis* türü üç farklı pestisit (phosmet, metil parathion ve ethion) bulunduğu ortamlara uygulanmıştır. Bu türün 7 gün sonunda methly parathionu %50,0, ethionu % 61,0 ve phosmeti ise %70,0 oranında uzaklaştırdığı görülmüştür. Çalışma sonucunda, kullanılan *S. platensis*'in bu pestisitlere karşı farklı biyoremediasyon etkilere sahip olduğu vurgulanmıştır.

Phosmet, hem bitkilerde hem de hayvanlarda kullanılan sistemik olmayan, organofosfatlı bir insektisittir. Bu pestisit akarların, meyve sineklerinin, yaprak bitlerinin yok edilmesi için süs bitkileri, meyve ağaçları (özellikle elma ağaçları) ve asmalarda kullanılmaktadır.

Ethion, böcek öldürücü olarak tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan pestisitlerdendir. İnsanın beyin ve sinir sisteminde anormalliklere neden olmaktadır.

Metil parathion, çok çeşitli böcek ve zararlıların kontrolü için yaygın olarak kullanılan organofosfatlı insektisit çeşitidir. Meyve ve

sebzelerde kalıntı bıraktığından dolayı Dünya Sağlık Örgütü tarafından çok tehlikeli pestisitler grubuna konulmuştur.

Tablo 2: Pestisitlerin biyoremediasyonunda kullanılan bazı mikroalg çeşitleri

Pestisit çeşidi	Mikroalg çeşidi
Mireks	<i>Chlorococcum</i> sp.
Organofosfor	<i>Synechococcus elongates</i>
Organofosfor	<i>Microcystes aeruginosa</i>
Naftalin	<i>Dunaliella</i> sp..
paration	<i>Scenedesmus obliquus</i>
Tokssapin	<i>Chlorella</i> sp.
Metoklor	<i>Chlorella</i> sp.
Atrazin	<i>Chlamydomonas mexicana</i>
Herbisit fluroxypyr	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Diazinon	<i>Chlorella vulgaris</i>
Kloropirifos	<i>Spirulina platensis</i>

Kaynak: Bhat & ark., 2020

Pestisit biyoremediasyonu için yaygın olarak kullanılan mikroalgler Tablo 2’de verilmiştir

Literatürde bazı ağır metallerin biyo-gideriminde mikroalgler ve siyanobakterilerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Şöyleki;

Bir araştırma Zhou & ark. (2014) tarafından yapılmıştır. Çalışmada, dört tatlı su yeşil mikroalg türlerinden *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* ve *Chlorella vulgaris*'in kullanılmıştır. Bu mikroalglerin atık sulardaki toplam nitrojeni, toplam fosforu, metalleri, farmasötikler ve kişisel bakım ürünlerini, endokrin bozucu kimyasalları biyo-giderim yetenekleri araştırılmıştır. Yedi gün sonra, bu dört alg türü tarafından toplam nitrojenin %76,7-92,3’ü ve toplam fosforun %67,5-82,2’si giderildiği bulunmuştur. Ayrıca dört mikroalg türü tarafından atık sudan metallerin

uzaklaştırılmasının metal türleri arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan türler özellikle ağır metallerden Pb, Ni ve Co'nın giderilmesinde düşük verimlilik göstermiştir. İlavenen, atık sulardaki organik ve inorganik kirleticilerin biyo-gideriminde mikroalglerin kullanılmasının uygun olduğu rapor edilmiştir.

Ghazal & ark. (2016) yaptıkları bir araştırmada tekstil atıksuların arıtılmasında *Anabaena fertilissima*, *Nostoc muscorum*, *Phormidium fragile* ve *Wolleea* sp. siyanobakterilerinin etkinliklerini incelemişlerdir. Ham petrolden kırmızı rengin ve demir, manganez, bor, kurşun ve arsenik gibi ağır metallerin uzaklaştırılmasının en yüksek yüzde oranına sahip olan siyanobakterinin *N. muscorum* olduğu görülmüştür. Bunu *Wolleea* sp., *P. fragile* ve *A. fertilissima* takip etmiştir.

Bazı inorganik besin ve ağır metallerin uzaklaştırılmasında *C. vulgaris* ve *Scenedesmus* sp. (Şekil 6, URL 5) cinslerine ait olan türler kullanılarak etkinlikleri araştırılmıştır (Şentürk, 2017). Araştırma sonucunda, *C. vulgaris* tarafından fosfat, nitrat, antimon, mangan, bakır ve nikelin giderim verimliliği sırasıyla %95,91, %21,63, %28,64, %49,41, %33,38 ve %29,96 olarak bulunmuştur. *Scenedesmus* sp. ise sırasıyla %98,15, %14,28, %10,05, %8,52, %30,18 ve %20,62 oranlarında biyo-giderim yapmıştır. Ayrıca *C. vulgaris* ve *Scenedesmus* sp.'nin laboratuvar şartlarında aşırı nutrient ve ağır metal giderimi üzerinde oldukça etkili mikroalgler olduğu saptanmıştır. Bundan dolayı iki mikroalgin atıksu arıtımında çok iyi birer biyoremediant olabileceği vurgulanmıştır.



Şekil 6: *Scenedesmus obliquus*

Kaynak:URL 5

3.2. Biyoremediasyon ve Mantarlar

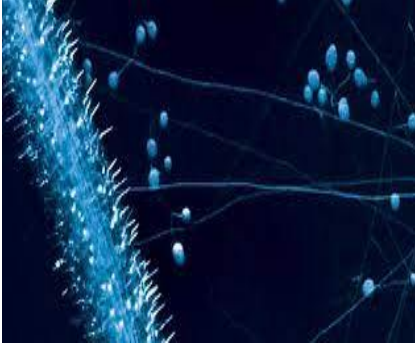
Mantarlar, üreme oranlarının yüksek, habitat çeşitliği, hifsel yapıları, çeşitli enzim ve salgı sistemleri, kültüre alınmalarının kolay olması, besi yerlerinin ucuz, biyokütle üretim miktarlarının fazla, patojenite göstermemeleri, genetik yapılarının kolay düzenlenmesi, kolay çoğalabilmeleri, bir yerden diğer yerlere daha kolay taşınabilmeleri ve yaşam döngülerinin uzun olması nedeniyle kirlenmiş toprakların biyoremediasyonunda kullanılan bitki, alg ve bakterilere göre daha dayanıklı yapmakta ve zaman zaman kimyasal ve fiziksel remediasyon ajanlarını yerine geçmelerine neden olmaktadır (Singh & ark., 2015; Vural, Demir & Boyno, 2018). Özellikle misel yapıları onlara topraktaki toksinleri besin zincirine girmeden önce etkisiz hale getirmelerine yardımcı olmaktadır. Ayrıca patojenite göstermediklerinden dolayı güvenle kullanılabilme özelliğine sahip olan canlılardır.

Biyoremediasyon yönteminde kullanılan mantarlar salgıladıkları enzimler ve miselli yapıları sayesinde inatçı olan çevresel kirleticileri indirgenmeleri, endüstriyel ve tarımsal sanayi atıklarını

ayırıştırıp kullanılabilir ürünlere dönüştürmelerinden dolayı büyük öneme sahiptirler (Kulshreshtha, Mathur & Bhatnagar, 2014). Mantarlar sporları sayesinde çok geniş alanlara dağılıbilirler ve çok değişik iklim tiplerine sahip olan alanlarda veya topraklarda yaşayabilirler (Anastasi, Tigini & Varese, 2013). Ayrıca bazı mantarlar bazı bakterilerle birlikte ekosistemin ayrıştırıcı canlılarını oluşturmaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı, tekstil, plastik, farklı ahşap türleri, deri, elektrik ızalasyonları, depolanmış kağıt ve çeşitli ambalaj ürünlerini yok edebilen, ekosistemde toksik olan kirleticileri parçalayabilen doğal ayrıştırıcılar olarak kullanılırlar. Biyoremediasyon sürecinde kullanılan mantarlar;

3.2.1. Mikorizal mantarlar: Mikorizal mantarlar, toprağın rizosfer bölgesinde yoğun olarak bulunurlar ve ektomikorizal ve endomikorizal mantarlar olarak iki gruba ayrılırlar. *Glomus intraradices* (Arbüsküler mikorizal mantarlar) (Şekil 7, URL 6) endomikorizal mantarların en yaygını türlerinden olup hem rizorferde hemde bitki köklerinde hiflerinin dallanması ile çok geniş alanlara yayılabilmektedir (Demir, 2002). Bu sayede kirleticileri uzaklaştırarak kökler için daha temiz yüzey alanları oluştururlar. Diğer taraftan, ektomikorizal mantarlar çok farklı kirleticileri ortamdan uzaklaştırdıkları için endomikorizal mantarlar göre mikoremediasyon uygulamalarında daha fazla tercih edilmektedirler. *Suillus bovinus* ve *Rhizopogon roseolus* ektomikorizal mantar türleri çam bitkisinin köklerinde simbiyoz olarak yaşarlar ve ortamda var olan kadmiyumun uzaklaştırılmasında oldukça etkili oldukları bulunmuştur (Sousa & ark., 2014). *Boletus edulis* Bull, *Gomphidius viscidus*, *Laccaria bicolor* (Maire) Orton ve *Leccinum scabrum* Gray (Şekil 8, URL 7) gibi

ektomikorizal mantarların DDT'yi parçaladıklarını bildirmiştir (Huang, Zhao & Luan, 2007).



Şekil 7: *Glomus intraradices* Şekil 8: *Leccinum scabrum*

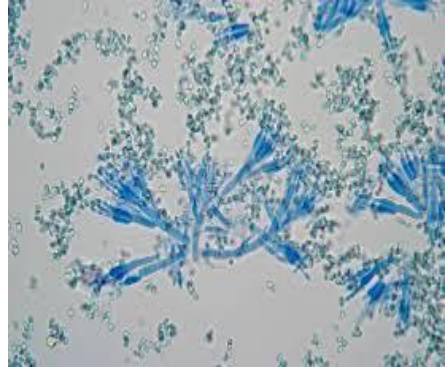
Kaynak: URL 6 Kaynak: URL 7

3.2.2. Deniz Mantarları: Bu mantarlar deniz ekosistemlerine karışan odunsu, otsu kirleticileri, lignin ve kitin gibi maddeleri rahatlıkla ayrıştırabilirler veya parçalayabilirler (Garzoli & ark., 2015). Deniz mantarları daha çok ağır metallerin ve hidrokarbonların biyoremediasyonunda kullanılırlar. Ayrıca yeni enzimler, polisakkaritler, ikincil metabolitler, çoklu doymamış yağ asitleri ve ikincil metabolitlerin üretiminde de oldukça önemlidirler (Damare, Purnima & Seshagiri, 2012). Örneğin, inatçı organik kirleticilerden olan PCB 118'nin *Penicillium* cinsine ait iki deniz mantarının, kalıcı organik kirleticiler ile pentaklorofenölü *Trichoderma harzianum*'un ayrıştırabildikleri rapor edilmiştir (Gao & ark. 2013; Vacondio & ark., 2015). Diğer taraftan, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., (Şekil 9, URL 8; Şekil 10, URL 9) *Mucor* sp., ve bazı mayaların, 0,01 ile 0,25 mg/mL konsantrasyonlarda suda çözünür ham yağ damıtık maddelerini rahatlıkla biyoremediasyon yapabilmektedir (Hickey, 2013).

3.2.3. Kahverengi Çürükçül Mantarlar: Bunlar, ahşap ürünlerdeki selüloz ve hemiselülozu ayrıştırabildikleri için son zamanlarda özellikle ahşap atıklarındaki metali uzaklaştırmak için yoğun olarak tercih edilmektedirler (Kim, Choi & Kim, 2009). *Gloeophyllum trabeum*, *Fomitopsis pinicola* (Şekil 11, URL 10; Şekil 12, URL 11) ve *Daedalea dickinsii* DDT (dikloro difenil trikloroethan)'nin bozulmasına neden olan kahverengi çürükçül mantar türleridir (Purnomo & ark., 2011).



Şekil 9: *Aspergillus* sp.



Şekil 10: *Penicillium* sp.

Kaynak: URL 8 Kaynak: URL 9



Şekil 11: *Gloeophyllum trabeum*



Şekil 12: *Fomitopsis pinicola*

Kaynak: URL 10 Kaynak URL 11

3.2.4.Beyaz Çürükçül Mantarlar: Beyaz çürükçül mantarlar, klorlu aromatik, alifatik hidrokarbonları, parçalanmaları zor olan lignini, boyar maddeleri, suda yaşayan canlılar için akut ve kronik toksisitesi olan maddeleri, endokrin bozucu kimyasalları (EDC) ve insan sağlığı için tehlikeli olan ilaçlar ve kişisel bakım ürünleri (PPCP) gibi kirleticileri salgıladıkları enzimleri vasıtasıyla kolaylıkla ayrıştırabilirler (Kapdan & ark. 2000). *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus* sp. (Şekil 13, URL 12; Şekil 14, URL 13) ve *Bjerkandera adusta* biyoremediasyon uygulamalarında kullanılan beyaz çürükçül mantarlardır (Dos Santos Bazanella & ark., 2016).



Şekil 13: *Trametes versicolor* Şekil 14: *Pleurotus ostreatus*

Kaynak: URL 12 Kaynak: URL 13

3.2.5. Ekstremofilik mantarlar: Bu mantarlar, bazı çevre koşullarına (pH, termotolerans ve diğer ekstrem koşullar) toleranslı olduğundan daha çok endüstriyel atıkların biyoremediasyonda kullanılmaktadır. Ayrıca bir alanın kirlilik oranının tespit edilmesinde de indikatör özelliği gösterirler (Neifar & ark., 2015). Örneğin, *Acidomyces acidophilum*, *Hortaea acidophila* ve *H. werneckii* (Şekil

15, URL 14) ekstremofilik mantar türlerindendir. Biyoremediasyonda kullanılan bazı mantar çeşitleri tablo 3’te sunulmuştur.



Şekil 15: Hortaeta werneckii

Kaynak: URL 14

Tarımsal üretimde kullanılan pestisitler sucul ekosistemlerde yoğun bir şekilde birikerek önemli sağlık problemlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bunun için pestisitlerin sucul ekosistemlerden uzaklaştırılması çok önemlidir. Pestisitlerin tarafından kirletilmiş alanların temizlenmesinde genellikle bakteriler kullanılmış olsa da son yıllarda farklı pestisitlerin uzaklaştırılmasında mantarların kullanıldığı araştırmalara da rastlanmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; pestisitlerle kirlenmiş ortamların iyileştirilmesinde mantarların başarılı bir şekilde kullanılabildiği tespit edilmiştir (Peng & ark., 2012; Silambarasan & Abraham, 2013; Madrigal-Zúñiga & ark., 2016; Morillo & Villaverde, 2017; Gül & Silah, 2017).

Peng & ark. (2012) bensulfuron-metili çok hızlı parçalayan *Penicillium pinophilum* mantarını sülfonilüre herbisit kirliliğinin giderilmesinde kullanmışlardır.

Tarım alanlarının klorpirifos pestisitinden temizlenmesinde *Aspergillus terreus* JAS1 kullanılmıştır (Silambarasan & Abraham, 2013). Araştırma sonuçları incelendiğinde, klorpirifos'u parçalayıcı mantar türünün, pestisitlerle kirlenmiş tarım topraklarını besin ilavesi olmadan bile parçalama potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır.

Madrigal-Zúñiga & ark. (2016) pestisit karbofuranın biyo-parçalanmasında ligninolitik mantar olan *Trametes versicolor* türünü kullanmıştır.

Tablo 3: Bioremediasyon uygulamalarında kullanılan bazı mantar çeşitleri

Kimyasal Bileşikler	Mantar çeşitleri
Poliklorlanmış dibenzofuranlar	White rot fungi, <i>Phanerochaete sordida</i>
Fenilüre herbisit diuron Tekstil boyaları	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>T. viride</i> , <i>A. sojae</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> , <i>Trichoderma</i> sp., White rot fungi, <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Ceriporia metamorphosa</i> , <i>Ganoderma</i> sp.
Poliklorlu bifeniller	<i>Doratomyces nanus</i> , <i>D. purpureofuscus</i> , <i>D. verrucisporus</i> , <i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Phoma eupyrena</i> , <i>Thermoascus crustaceus</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Difenil eter	White rot fungi, <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Metalaxyl ve Folpet	<i>Gongronella</i> sp., <i>R. stolonifer</i>
Petrol ürünleri Ham Petrol	<i>A. niger</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Mucor</i> sp
Kafeinler	<i>Penicillium</i> , <i>Stemphylium</i> " kelimeleri" <i>Penicillium</i> sp., <i>Stemphylium</i> sp.
Sitalopram, Fluoksetin, Sulfametoksazol	<i>Bjerkandera</i> sp. R1, <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>

Klorlanmış hidrokarbonlar	<i>P. ostreatus</i>
Ağır metaller	<i>Aspergillus</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Acrimonium</i> , " <i>Aspergillus flavus</i> " kelimeleri " <i>Aspergillus</i> , <i>Curvularia</i> sp., <i>Acrimonium</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i>
Chloropyriphos	<i>Aspergillus terreus</i>
Benzin Değirmen atıkları	<i>Exophiala xenobiotica</i> , <i>Rhizopus</i> <i>oryzae</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i>
Deri atıkları	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>A.niger</i> , <i>A. jegita</i>

Kaynak: Deshmukh, Khardenavis & Purohit, 2016

Tablo 4: Bazı Pestisitler ile kirlenmiş topraklarda mantarların biyoremediasyonu

Pestisit çeşidi	Kirlenmiş alan	Mantar çeşidi	Pestisit iyileştirmesi
Karbofuran (böcek ilacı)	Kompost ve turba	Ligninolitik mantar <i>Trametes versicolor</i> , organik gübre	48 gün sonra %100 biyolojik olarak bozunur.
Bensülfüron- metil (Bitki öldürücü)	Laboratuvar (Tarımsal toprak)	<i>Penicillium pinophilum</i> suşu, BP-H-02	60 saat sonra%87 biyolojik olarak bozunur
Klorpirifos (Bitki öldürücü)	Laboratuvar (çeltik alan toprakları)	<i>Aspergillus terreus</i> JAS1	48 saat sonra %100 biyolojik olarak bozunur.

Kaynak: Morillo & Villaverde, 2017

Yukarıdaki tablo 4'te pestisitler tarafından kirlenmiş ortamların temizlenmesinde kullanılan mantar çeşitleri bulunmaktadır (Morillo & Villaverde, 2017).

Atrazin (herbisit) tarım alanlarında çok yaygın olarak kullanılmakta olup canlılarda zehir etkisi yapmaktadır. *Rhizopus arrhizus* filamentli bir mantar türü olup pestisitlerle kirletilmiş sıvı ortamların temizlenmesinde kullanılmış ve böyle ortamlardan atrazin giderimini pH'ın 4 ve 6, biyokütlenin %57,45 ve %63,16 olduğu değerlerde hızlı bir şekilde gerçekleştirmiş olduğu rapor edilmiştir (Gül & Silah, 2017).

Mikroplastik kirliliği dünya çapında yeni ortaya çıkan bir çevre sorunudur. Mikroplastikler atmosferik, karasal ve sucul ekosistemler ile pek çok canlının yapısında tespit edilmiştir (Liu & ark., 2022; Xu & ark., 2022). Çok sayıda çalışma, mikroplastiklerin organizmalar üzerindeki olumsuz etkilerini kanıtlamıştır. Bu plastikler canlılarda mide enzim salgısının inhibisyonuna, tokluk nedeniyle beslenmenin baskılanmasına, steroid hormon düzeylerinin dengesizliğine, yüzme performansının azalmasına, bağırsak yollarının tıkanmasına, yumurtlamanın gecikmesi ve kısırlığa, oksidatif strese bağlı nörotoksisiteye neden olmaktadır (Sharma & Chatterjee, 2017).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda mantarların mikroplastikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneklerinin olduğu görülmüştür (Zeghal & ark., 2021). Deniz çevresinden izole edilen filamentli mantarlar, çevre kirliliğine neden olan çeşitli polimerleri bozabildikleri belirlenmiştir. Mikroplastiklerin yapılarındaki kimyasal bağları parçalamak için mantarlar çok çeşitli enzimler üretmektedirler. *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Purpureocillium lilacinum*, *Fusarium oxysporum*, ve *F. falciforme* mantarlarının plastiği parçalama yeteneğine sahip oldukları rapor edilmiştir (Zeghal & ark., 2021; Spina & ark., 2021).

Polietilen (PE) ürünleri, kolaylıkları ve ekonomik değerleri nedeniyle günlük yaşamda, tarımda ve sanayide yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak PE, bozunmaya karşı son derece dirençli polimer malzemelerden birisidir ve mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla parçalanamaz.

Tablo 5: Plastik bozunma potansiyeli gösteren bazı mantarlar

Plastik türleri	Mantar türleri
LDPE	<i>Aspergillus caespitosus</i>
PE ve HDPE	<i>Aspergillus flavus</i>
HDPE	<i>Aspergillus flavus</i> VRKPT2
LDPE	<i>Alternaria alternata</i>
PE ve LDPE	<i>Aspergillus fumigatus</i>
PU	<i>Aspergillus fumigatus</i>
PE	<i>Aspergillus glaucus</i>
PE ve LDPE	<i>Aspergillus niger</i>
LDPE	<i>Aspergillus nomius</i>
LDPE	<i>Aspergillus oryzae</i>
PU	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
PU ve LDPE	<i>Fusarium oxysporum</i>
PET	<i>Fusarium solani</i>
PS(polistiren sülfonat)	<i>Gloeophyllum trabeum</i>
LDPE ve HDPE	<i>Penicillium chrysogenum</i>
PE ve PU	<i>Penicillium griseofulvum</i>
LDPE	<i>Trichoderma viride</i>
PE ve PU	<i>Xepiculopsis graminea</i>
PE	<i>Trichoderma harzianum</i>

PE:Polietilen, PU: Poliüretan, LDPE:Düşük yoğunluklu polietilen, HDPE: Yüksek yoğunluklu polietilen, PS: Polistiren sülfonat

Kaynak: Zeghal & ark., 2021

Yukarıda plastikleri parçalayabilen bazı mantar türleri verilmiştir (Tablo 5).

Mevcut plastik atık bertaraf yöntemleri çevre için bir tehdit oluşturmakta ve birikmesi nedeniyle küresel bir çevre sorunu haline gelen mikropplastik parçacıklar (MPP) üretmektedir. Alshehrei (2017) tarafından *Penicillium* sp.'nin polietileni bozabilme yeteneğinin %43,4 olduğu rapor edilmiştir.

Başka bir çalışmada, Ojha & ark. (2017) *Penicillium oxalicum* ve *P. chrysogenum* suşlarının plastikleri parçalama özelliklerine sahip olduklarını bulmuşlardır.

Plastik üretimi her geçen yıl artmaktadır. Bunlar nehirlerde ve okyanuslarda makro, mezo, mikro ve nanoplastikler şeklinde birikmekte olup canlılar için tehdit oluşturmaktadır. Paço & ark. (2017) deniz mantarı *Zalerion maritimum* tarafından polietilen mikropplastiklerinin biyolojik olarak parçalanmasını araştırmıştır. Araştırma sonuçları, bu mantar türünün mikropplastikleri biyolojik olarak parçaladığını göstermektedir.

Çeşitli ortamlardan izole edilen (toprak, deniz ortamı, wax moth gut) *Aspergillus flavus* mantarı polietileni parçalama potansiyeli göstermiştir (Zhang & ark., 2020). Tablo 5'da Bazı plastik çeşitlerini parçalama yeteneğine sahip olan mantar türleri verilmiştir.

Sonuç

Mikroalglerin atıksulardaki çeşitli boyalarının arıtılmasında, pestisitleri, organik ve inorganik maddeleri, ağır metalleri ve nütrientleri uzaklaştırmada oldukça başarılı oldukları görülmüştür (Şişman Aydın, 2018). Literatürde, tekstil atıksularının ve farklı boyaların temizlenmesinde/giderilmesinde kullanılan farklı mikroalg ve siyanobakterilerle yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle, *Chlorella vulgaris* mikroalgi çeşitli boyaların, ağır metallerin

ve pestisitlerin biyo-gideriminde çok fazla kullanılmıştır. Ayrıca siyanobakteri türlerinden olan *Cyanobacterium aponinum* daha çok atık sulardaki boya, *Spirulina platensis* ise atık sulardaki hem boya hem de pestisit biyo-giderim/temizlenme yeteneklerinin olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır.

Çeşitli endüstriyel ve tarımsal atıkların üzerinde yaşayabilen mantarlar, kirleticileri ayrıştırabilen, yaşadıkları alanlarda biyolojik çeşitliliği artıran ve miselli yapılarından dolayı doğadaki besin iletiminde önemli görevleri olan eşsiz güzelliğe sahip gizemli canlılardır. Birçok bitkisel, endüstriyel ve tarımsal atığın da değerlendirilmesinde önemli rolleri vardır. Mantarlar bazı özelliklerinden dolayı biyoremediasyon uygulamalarında çok fazla tercih edilmektedirler. Yani mantarların biyoremediasyon uygulamalarında kullanılma yelpazeleri oldukça (pestisitler, ağır metaller, klorlu aromatik, alifatik hidrokarbonlar, parçalanmaları zor olan lignin, kitin, boyar maddeler, akut ve kronik toksisitesi olan maddeler, endokrin bozucu kimyasallar, tehlikeli olan ilaçlar ve kişisel bakım ürünleri) geniştir. Diğer taraftan, günümüzün önemli çevre problemi olan özellikle sucul ekosistemlerdeki mikroplastik kirliliğinin giderilmesinde de bazı mantar türleri (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. ve *Fusarium* sp.) önemli rol oynamaktadır.

“Toprağın iyileştirilmesi gelecek için bir mirastır” sözü unutulmamalıdır. Toprağın yapısını bozmadan kirlenmiş alanların rehabilitasyonu ve sürdürülebilir kullanılması bütün dünya ülkelerin geleceği için oldukça elzem olan konulardandır. Bundan dolayı yapılacak olan çalışmalarla biyoremediasyon uygulamalarında kullanılabilecek değişik mantar, mikroalg ve siyanobakteri türleri keşfedilebilir.

Kaynaklar

Abdel-Razek, M.A., Abozeid, A.M., Eltholth, M.M., Abouelenien, F.A., El-Midany, S.A., Moustafa, N.Y. & Mohamed, R.A. (2019). Bioremediation of a pesticide and selected heavy metals in wastewater from various sources using a consortium of microalgae and cyanobacteria, *Slovenian Veterinary Research*, 56(22), 61–74. Doi: 10.26873/SVR-744-2019.

Abou-El-Souod, G.W. & El-Sheekh, M.M. (2016). Biodegradation of Basic Fuchsin And Methyl Red by the Blue Green Algae *Hydrocoleum oligotrichum* and *Oscillatoria limnetica*. *Environmental Engineering and Management Journal*, 15(2), 279–286. Doi:10.30638/eemj.2016.028.

Adeniyi, A. A. & Afolabi, J.A. (2002). Determination of total petroleum hydrocarbons and heavy metals in soils within the vicinity of facilities handling refined petroleum products in lagos metropolis. *Environmental International*, 28(1-2), 79–82. Doi: 10.1016/s0160-4120(02)00007-7.

Alshehrei F. (2017). Biodegradation of Low Density Polyethylene by Fungi Isolated from Red Sea Water. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 1703-1709. Doi: 10.20546/ijcmas.2017.608.204.

Aminfarzaneh, H. (2010). *Siyanobakterilerde Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Biyokütle Üretimi ve Pestisit Giderimi Üzerine Etkisi*, Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.

Anastasi, A., Tigini, V. & Varese, G.C. (2013). The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi.

In A. Anastasi, V. Tigini & G.C. (Eds.), *Fungi as bioremediators*. (pp. 29–49). Berlin, Heidelberg: Springer.

Baldev, E., Mubarak Ali, D., Ilavarasi, A., Pandiaraj, D., Ishack, K.S.S. & Thajuddin, N. (2013). Degradation of synthetic dye, Rhodamine B to environmentally nontoxic products using microalgae. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 105, 207–214. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.008.

Bela, R.B. & Malliga, P. (2015). Treatment of textile dye effluent using marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. with different agrowastes and its effect on the growth of cyanobacterium. *Journal of Environmental Biology*, 36(3), 623–326.

Bharagava, R.N., Saxena, G. & Mulla. S.I. (2020). Introduction to Industrial Wastes Containing Organic and Inorganic Pollutants and Bioremediation Approaches for Environmental Management. In G. Saxena & R.N. Bharagaya (Eds.), *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety* (pp. 1–18). Singapore: Springer Nature Singapore.

Bhat, S.A., Qadri, H., Cui, G. & Li, F. (2020). Remediation of Pesticides Through Microbial and Phytoremediation Techniques. *Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation*, 235–245. Doi: 10.1007/978-981-13-8277-2_13.

Biyouki, A.Y., Noroozifar, M., Farazmand, A. & Assadi, M. (2018). Biodegradation of Coloured Textile Industrial Wastewater using *Chlorella vulgaris*. *Asian Journal of Chemistry*, 30(3), 575–578. Doi: 10.14233/ajchem.2018.21005.

Boduroğlu, G., Kılıç, N.K. & Dönmez, G. (2014). Bioremoval of Reactive Blue 220 by *Gonium* sp. biomass. *Environmental technology*, 35(19), 2410–2415. Doi: 10.1080/09593330.2014.908240.

Brahmbhatt, N.H. & Jasrai, R.T. (2016). The role of algae in bioremediation of textile effluent. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 4(1), 443–453.

Cáceres, T., Megharaj, M. & Naidu, R. (2008). “Biodegradation of The Pesticide Fenamiphos By Ten Different Species Of Green Algae and Cyanobacteria. *Current Microbiology*, 57, 643–646. Doi: 10.1007/s00284-008-9293-7.

Ceyhan, N. & Esmeray, E. (2012). Petrol kirliliği ve biyoremediasyon. *Türk Bilimsel Derleme Dergisi*, 5(1), 95–101.

Chia, M.A., Odoh, O.A. & Ladan, Z. (2014). The indigo blue dye decolorization potential of immobilized *Scenedesmus quadricauda*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(4), 1920. Doi: 10.1007/s11270-014-1920-2.

Chowdhury, S., Bala, N.N. & Dhauria, P. (2012). Bioremediation-A Natural Way For Cleaner Environment. *International Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences*, 2(4), 600–611.

Coelho, L.M, Rezende, H.C., Coelho, L.M., Sousa, P.A.R., Melo, D. & Coelho, N. (2015) Bioremediation of polluted waters using microorganisms. In S. Nasofumi (ed.), *Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil* (pp. 1–23). InTech, Rijeka, Croatia.

Connell, L. & Staudigel, H. (2013). Fungal diversity in a dark oligotrophic volcanic ecosystem (DOVE) on Mount Erebus, Antarctica. *Biology*, 2(2), 798–809. Doi: 10.3390/biology2020798.

Damare S, Purnima S, Seshagiri R (2012). Biotechnology of marine fungi. In C. Raghukumar (ed.), *Biology of Marine Fungi*. (pp. 277–297). Berlin, Heidelberg: Springer.

Dellamatrice, P.M., Silva-Stenico, M.E., Moraes, L.A.B.D., Fiore, M.F. & Monteiro, R.T.R. (2017). Degradation of textile dyes by cyanobacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 25–31. Doi: 10.1016/j.bjm.2016.09.012.

Demirel, Z., Tok, R., İltter, I., Akyıl, S., Erdoğan, A., Koç, M., Kaymak Ertekin, F. & Conk Dalay, M. (2018). Biyokütle için mikroalg ve siyanobakteri'nin büyük ölçekte üretimi, *Aquatic Research*, 1(2), 64–76. Doi: 10.3153/AR18008.

Demir, S. (2002). Mikorhizal Fungus *Glomus intraradices* (Schenck & Smith)'in Bazı Sebze Bitkilerinin Köklerinde Kolonizasyonu. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 12(1), 53–57.

Deshmukh, R., Khardenavis, A.A. & Purohit, H.J. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 56(3), 247–264. Doi: 10.1007/s12088-016-0584-6.

Dindar, E., Şağban, F. & Başkaya, H. (2010). Bioremediation of Contaminated Soil. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 15 (2), 123–137. Doi:10.17482/uujfe.62459.

Diplock, E.E., Mardlin, D.P., Killham, K.S. & Paton, G.I. (2009). Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale. *Environmental Pollution*, 157, 1831–1840. Doi: 10.1016/j.envpol.2009.01.022.

Dos Santos Bazanella, G.C., Araújo, C.A.V., Castoldi, R., Maria, G., Maciel, F.D.I., Marques, C.G. & Peralta, R.M. (2016). Ligninolytic enzymes from white-rot fungi and application in the removal of synthetic dyes. In M. de. Lourdes, T.M. Polizeli & M. Rai (eds.), *Fungal enzymes*, (1st ed., pp. 258). Brazil: CRC Press.

El-Kassas, H.Y. & Mohamed, L.A. (2014). Bioremediation of the textile waste effluent by *Chlorella vulgaris*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(3), 301–308. Doi: 10.1016/j.ejar.2014.08.003.

El-Sheekh, M.M., Gharieb, M.M. & Abou-El-Souod, G. W. (2009). Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(6), 699–704. Doi:10.1016/j.ibiod.2009.04.010.

Erkoç, E. (2020). *Boyar madde biyoremidiasyonunda termofilik mikroalg ve siyanobakterlerin kullanım kapasitesinin araştırılması*. Yüksek lisan tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Fioravante, I.A., Barbosa, F.A.R., Augusti, R. & Magalhães, S.M.S. (2010). Removal of methyl parathion by cyanobacteria *Microcystis novacekii* under culture conditions. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(6), 1302–1306. Doi: 10.1039/b923288e.

Gao, G.R., Yin, Y.F., Yang, D.Y. & Yang, D.F. (2013). Promoting behavior of fungal degradation Polychlorinated Biphenyl by Maifanite. *Advanced Materials Research*, 662, 515–519. Doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.662.515.

Garzoli, L., Gnani, G., Tamma, F., Tosi, S., Varese, G.C & Picco, A.M. (2015). Sink or swim: Updated knowledge on marine fungi associated with wood substrates in the Mediterranean Sea and hints about their potential to remediate hydrocarbons. *Progress in Oceanography*, 137, 140–148. Doi: 10.1016/j.pocean.2015.05.028.

Ghazal, F.M., Battah, M.G., Abd El-Aal, A.A., Eladel, H.M. & Adly, S.E. (2016). Studies on the efficiency of cyanobacteria on textile wastewater treatment. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 7(4), 2925–2931.

Gillespie, I.M. & Philp, J.C. (2013). Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends in biotechnology*, 31(6), 329–332. Doi: 10.1016/j.tibtech.2013.01.015.

Gül, Ö. (2021). *Endüstriyel atıkların mikroalgler ile biyoremediasyonu*. Yüksek lisans tezi. İskenderun Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. İskenderun.

Gül, Ü.D. & Silah, H. (2017). Tarımda Kullanılan Atrazinin Gideriminde *Rhizopus arrhizus* Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi. *Gıda*, 42(3), 261–267. Doi: 10.15237/gida.GD16112.

Gül, Ü.D & Yavuz, Ş.A. (2018). Pestisitler Kirlenmiş Ortamların Biyoremediasyonu. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 11 (1), 7–17.

Hernández-Zamora, M., Cristiani-Urbina, E., Martínez-Jerónimo, F., Perales-Vela, H.V., Ponce-Noyola, T., del Carmen

Montes-Horcasitas, M. & CañizaresVillanueva, R.O. (2015). Bioremoval of the azo dye Congo Red by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10811–10823. Doi: 10.1007/s11356-015-4277-1.

Hickey, P. (2013). Toxicity of water soluble fractions of crude oil on some bacteria and fungi Isolated from marine water. *American Journal of Animal Research*, 3, 24–29.

Huang, Y., Zhao, X. & Luan, S. (2007). Uptake and biodegradation of DDT by 4 ectomycorrhizal fungi. *Science of the Total Environment*, 385(1-3), 235-241. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.04.023.

İsmail, G.A., Allam, N.G., El-Gemizy, W.M. & Salem, M.A. (2020). The role of silver nanoparticles biosynthesized by *Anabaena variabilis* and *Spirulina platensis* cyanobacteria for malachite green removal from wastewater. *Environmental Technology*, 42(28), 4475–4489. Doi: 10.1080/09593330.2020.1766576.

Kapdan, I., Kargi, F., McMullan, G. & Marchant, R. (2000). Comparison of white-rot fungi cultures for decolorization of textile dyestuffs. *Bioprocess Engineering*, 22(4), 347–351. Doi:10.1007/s004490050742

Karacakaya, P., Kılıç, N.K., Duygu, E. & Dönmez, G. (2009). Stimulation of reactive dye removal by cyanobacteria in media containing triacontanol hormone. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2-3), 1635–1639. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.08.037.

Kim, G.H., Choi, Y.S., Kim, J.J. (2009). Improving the efficiency of metal removal from CCA-treated wood using brown rot

fungi. *Environmental Technology*, 30(7), 673–679. Doi: 10.1080/09593330902858906.

Kulshreshtha, S., Mathur, N. & Bhatnagar, P. (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express*, 4(1), 29. Doi: 10.1186/s13568-014-0029-8.

Kurade, K.B., Kim, J.R., Govindwar, S.P. & Jeon, B.H. (2016). Insights into microalgae mediated biodegradation of diazinon by *Chlorella vulgaris*: Microalgal tolerance to xenobiotic pollutants and metabolism, *Algal Research*, 20, 126–134. Doi: 10.1016/j.algal.2016.10.003.

Liu, S., Pan, Y.F., Li, H.X., Lin, L., Hou, R., Yuan, Z. & Xu, X.R. (2022). Microplastic pollution in the surface seawater in Zhongsha Atoll, South China Sea. *Science of The Total Environment*, 822, 153604. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153604.

Madrigal-Zúñiga, K., Ruiz-Hidalgo, K., ChinPampillo, J.S., Masís-Mora, M., CastroGutiérrez, V. & Rodríguez-Rodríguez, C.E. (2016). “Fungal bioaugmentation of two rice husk-based biomixtures for the removal of carbofuran in on-farm biopurification systems”. *Biology and Fertility of Soils*, 52, 243–250. Doi: 10.1007/s00374-015-1071-7.

Morillo, E. & Villaverde, J. (2017). “Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils.” *Science Total Enviroment*, 586, 576-597. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.020.

Neifar, M., Maktouf, S., Ghorbel, R.E., Jaouani, A. & Cherif, A. (2015). Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. In V.K. Gupta & M.G. Tuohy (Eds.), *Biotechnology*

of bioactive compounds: sources and applications (pp. 245–267). Wiley-Blackwell.

Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A. Khatua, P., Rai, V. & Bose, R. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13. Doi: 10.1038/srep39515.

Omar, H.H. (2008). Algal decolorization and degradation of monoazo and diazo dyes. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(10), 1310–1316. Doi: 10.3923/pjbs.2008.1310.1316.

Oyebamiji, O.O., Boeing, W.J., Holguin, F.O., Ilori, O. & Amund, O. (2019). Green microalgae cultured in textile wastewater for biomass generation and biodegradation of heavy metals and chromogenic substances. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100247. Doi: 10.1016/j.biteb.2019.100247.

Paço, A., Duarte, K., da Costa, J.P., Santos, P.S.M., Pereira, R., Pereira, M.E., Freitas, A.C., Duarte, A.C. & Rocha-Santos, T.A.P. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the total Environment*, 586, 10-15. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.017.

Peng, X., Huang, J., Liu, C., Xiang, Z., Zhou, J. & Zhong, G. (2012). “Biodegradation of bensulphuronmethyl by a novel *Penicillium pinophilum* strain BP-H-02”. *Journal of Hazardous Materials*, 213, 216–221. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.01.077.

Purnomo, A.S., Mori, T., Takagi, K. & Kondo, R. (2011). Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi.

International Biodeterioration & Biodegradation, 65(5), 691–695. Doi: 10.1016/j.ibiod.2011.04.004.

Sharma, S. & Chatterjee, S. (2017). Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(27), 21530–21547. Doi: 10.1007/s11356-017-9910-8.

Silambarasan, S. & Abraham, J. (2013). “Ecofriendly method for bioremediation of chlorpyrifos from agricultural soil by novel fungus *Aspergillus terreus* JAS1”. *Water Air Soil Pollution*, 224(1), 369. Doi:10.1007/s11270-012-1369-0.

Singh, M., Srivastava, P.K., Verma, P.C., Kharwar, R.N., Singh, N. & Tripathi, R.D. (2015). Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5), 1278–1290. Doi: 10.1111/jam.12948.

Spina, F., Tummino, M.L., Poli, A., Prigione, V., Ilieva, V., Cocconcelli, P., Puglisi E., Bracco, P., Zanetti, M. & Varese, G.C. (2021). Low density polyethylene degradation by filamentous fungi. *Environmental Pollution*, 274, 116548. Doi: 10.1016/j.envpol.2021.116548.

Soni, R.A., Sudhakar, K. & Rana, R.S. (2017). Spirulina – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 157–171. Doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.010.

Sousa, N.R., Ramos, M.A., Marques, A.P. & Castro, P.M. (2014). A genotype dependent-response to cadmium contamination in soil is displayed by *Pinus pinaster* in symbiosis with different

mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 76, 7–13. Doi: 10.1016/j.apsoil.2013.12.005.

Şentürk, T. (2017). *Bazı Ağır Metal ve Nutrientler Üzerinde Chlorella vulgaris ve Scenedesmus sp. (Chlorophyta)'nin Adsorban Etkisinin Araştırılması*. Doktora tezi. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Manisa.

Şişman Aydın, G. (2018). Mikroalg Teknolojisi ve Çevresel Kullanımı, *Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi*, 4(2), 17–26.

Şişman-Aydın, G. & Oral, R. (2014). Investigation of The Hormesis/Toxicity Potential of Manisa (Turkey) Urban Wastewater Treatment Plant by using Selenastrum Capricornutum Printz, *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(5), 1183– 1189.

Thengodkar, R.R.M. & Sivakami, S. (2010). Degradation of Chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium Spirulina platensis. *Biodegradation*, 21(4), 637–644. Doi: 10.1007/s10532-010-9331-6.

URL1.https://www.cevremuhendisligi.org/index.php/82-haberler/yazar-za/1521-mikroorganizmalarla-anlasma-biyoremediasyon#google_vignette

URL 2. <https://www.star-ayurveda.com/spirulina-platensis/>

URL3.<https://algae-lab.com/shop/living-algae/culture-starter/spirulina-maxima-live-algae-2/>

URL4.<https://wholisticmatters.com/chlorella-vulgaris-microalgae>

URL5.<https://www.codybluesolutions.com/scenedesmus-obliquus>

URL 6. <https://www.ptagtiv.com/en/blog/myco-species/>

URL7.<https://www.first-nature.com/fungi/leccinum-scabrum.php>

URL 8. <https://www.pinterest.com/pin/303148618645725558/>

URL9.<https://www.chungvisinh.com/penicillium-sp-nbr-101300.html/>

URL10.<https://www.flickr.com/photos/atrnkoczy/22545414395>

URL 11. https://en.wikipedia.org/wiki/Fomitopsis_pinicola

URL12.<https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/trametes-versicolor>

URL 13. https://en.wikipedia.org/wiki/Pleurotus_ostreatus

URL 14. https://en.wikipedia.org/wiki/Hortaea_werneckii

Vacondio, B., Birolli, W.G., Ferreira, I.M., Selegim, M.H., Gonçalves, S., Vasconcellos, S.P. & Porto, A.L. (2015). Biodegradation of pentachlorophenol by marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* CBMAI 1677 isolated from ascidian *Didemnum ligulum*. *Biocatalysis and a Agricultural Biotechnology*, 4(2), 266–275. Doi: 10.1016/j.bcab.2015.03.005

Vural, A., Demir, S. & Boyno, G. (2018). Biyoremediasyon ve Fungusların Biyoremediasyonda Kullanılması. *Yüzüncü Yıl*

Üniversitesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 28(4), 490–501. Doi: 10.29133/yyutbd.418430.

Xu, G., Yang, L., Xu, L., Yang, J. (2022). Soil microplastic pollution under different land uses in tropics, southwestern China. *Chemosphere*, 289, 133176. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133176.

Zeghal, E., Vaksmaa, A., Veilfeure, H., Boekhout, T. & Niemann, H. (2021). The potential role of marine Fungi in plastic degradation-A review. *Frontiers in Marine Science*, 8, 1–17. Doi: 10.3389/fmars.2021.738877.

Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H., Bi, Q. & Zhao, Y. (2020). Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of the total Environment*, 704, 135931. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135931.

Zhou, G.J., Ying, G.G., Liu, S., Zhou, L.J., Chen, Z.F. & Peng, F.Q. (2014). Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green microalgae. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(8), 2018–2027. Doi:10.1039/c4em00094c.

Zhou, T., Wang, J., Zheng, H., Wu, X., Wang, Y., Liu, M. & Liu, Y. (2018). Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 269, 285–291. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.08.131

BÖLÜM III

Kanserde Hücre Ölüm Yolaklarının Önemi

Ayşe Müge ALDIRAN¹
Gül ÖZCAN²

Giriş

Çok hücreli canlılar homeostazisini koruyabilmek için mitoz, farklılaşma, hücre ölümü gibi süreçlerden geçmektedirler. Canlılarda iç dengenin stabilizasyonu ve yaşamsal süreçlerin hatasız gerçekleşebilmesi için her gün binlerce hücre ölümü gerçekleşirken çeşitli hastalıklarda bu mekanizma bozulmuş durumdadır (Chiong & ark., 2011).

Hücre ölümleri, programlı ve programsız olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Programlı hücre ölümleri içerisinde en iyi karakterize edileni apoptoz olup programsız hücre ölüm biçimi ise

¹ Ayşe Müge Aldıran, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, ORCID: 0000-0001-5775-5963, mugesahinn91@gmail.com

² Prof. Dr. Gül Özcan, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul, ORCID: 0000-0003-0682-5065, gozcan@istanbul.edu.tr

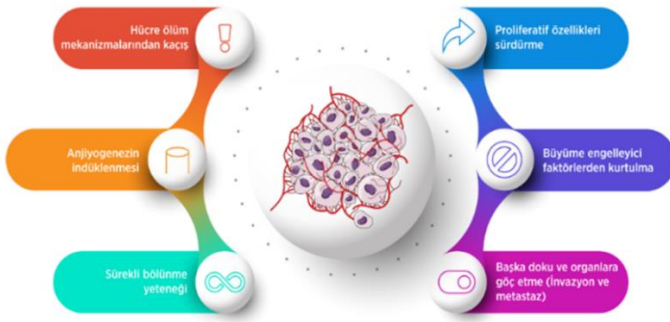
nekroz olarak adlandırılmaktadır (Ishikawa & ark., 2015). Programlı hücre ölümlerinde inflamasyon görülmeyip hücre içeriği hücreler arası boşluğa dağılmamaktadır. Programsız hücre ölümünde ise inflamasyon söz konusudur. Ayrıca, bazı programlı hücre ölüm çeşitlerinde kaspaz yollarının aktivasyonu mevcuttur. Hücrede zar bütünlüğünün kaybı, nukleusun parçalanması ve atıkların fagositozla yok edilmesi hücre ölümlerinin bazı belirteçleridir. (Del Re & ark., 2019). Yapılan çalışmalar sonucunda; hücre ölümlerinin oldukça karmaşık sinyal yolları, ifadesi artmış çeşitli genler ve birbiriyle bağlantılı, iç içe geçmiş mekanizmalar içerdiği belirlenmiştir.

Başta kanser olmak üzere, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde hücre ölüm yollarının mekanizmasının anlaşılması oldukça önem arz etmektedir (Tong & ark., 2019). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın paylaştığı verilere göre gerekli önlemler alınmazsa, 2030 yılında 22 milyon yeni kanser vakasının ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, kanser tedavisi için yeni sentezlenen maddelerin ve bitki ekstresi gibi doğal bileşiklerin hücre ölüm yolları üzerindeki etkilerinin araştırılması umut vaat etmektedir.

1.Kanser

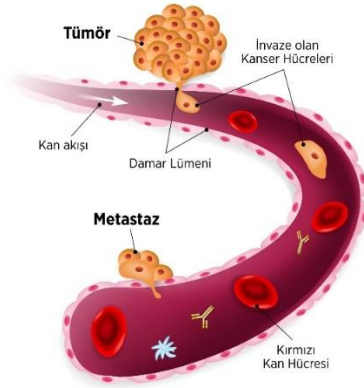
Kanser, doku büyümesinin düzenlenmesindeki hatalardan kaynaklanan bir hastalık olarak tanımlanmakta olup dünyadaki başlıca ölüm nedenlerinden biridir. Mutajenler, kimyasallar, virüsler, genetik yatkınlık kanserin başlıca nedenleri arasında gösterilmektedir.

Kanser hücrelerinde, bölünme esnasında kontrol noktalarından kaçma ve programlı hücre ölümüne uğramama söz konusudur. Bu nedenle, hasarlı hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalarak dolaşım yoluyla çevre dokulara yayılım göstermektedir (Eling & ark., 2015). Bağışıklık sistemi, anormal ve hasarlı hücreleri ortadan kaldırırken kanser hücreleri bu durumdan etkilenmez (Şekil 1).



Şekil 1. Kanser Hücresinin Özellikleri

Kanser hücrelerinin kontakt inhibisyon mekanizmaları ortadan kalkmış olup diğer hücrelerle temas ettiklerinde çoğalmayı sürdürmektedirler (Manz & ark., 2016). Anormal çoğalan hücreler, anjiyogenez yaparak yeni kan damarları oluşturmakta ve bu yolla metastaz yapmaktadırlar (Şekil 2).



Şekil 2. Kanser Hücrelerinde Metastaz

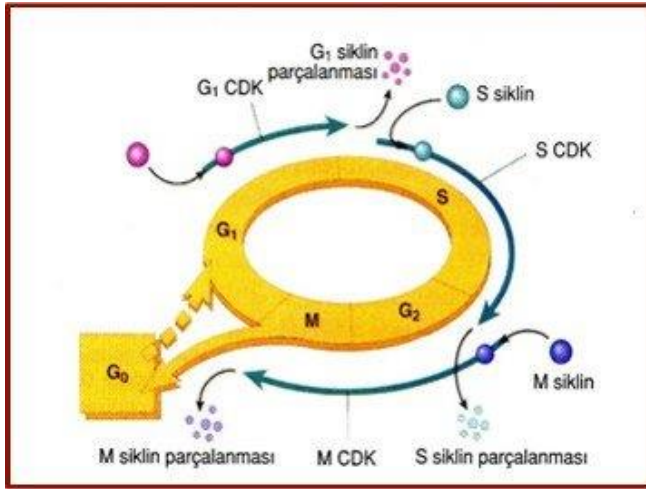
Hücre Siklusunun Kontrol Noktaları ve Kanser Genetiği

Bir hücrenin bölünmeye başlamasından yeni bir hücre oluşana kadar geçen süre hücre siklusu olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç; interfaz evresi ve mitotik evreden oluşmaktadır. İnterfaz evresinde hücre bölünmek için gerekli hazırlıkları yapar. Bunlar; DNA eşlenmesi, hücrenin yeterli büyüklüğe ulaşması, protein, organel, ATP sentezi gibi olayları kapsar. Mitotik evrede ise çekirdek ve sitoplazma bölünmeleri gerçekleşir (Bogdan & ark., 2016).

Hücre siklusunda G1/S, G2/M ve M kontrol noktaları bulunur. G1 ve G2 kontrol noktaları interfaz, M kontrol noktası ise metafaz evresindedir. G1/S kontrol noktasında, DNA hasarı olup olmadığı kontrol edilir ve DNA hasarlıysa tamir mekanizmaları aktive olur. Hasarlanma onarılamayacak boyuttaysa hücre, programlı hücre ölümüne sevk edilir (Riffle & ark., 2017). G2/M kontrol noktasında; DNA replikasyonunun tamamlanıp tamamlanmadığı, hücre büyüklüğü ve hücrenin mitoz başlama

yeterliliği denetlenir. M kontrol noktasında ise kromozomların iğ ipliklerine tutunup tutunmadığına bakılır.

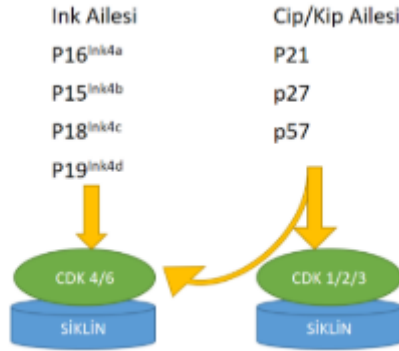
Siklusun ilerlemesi siklin, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) tarafından kontrol edilir (Trypathy, Bardia & Sellers, 2017). Siklin bağımlı kinazlar, döngünün ilerlemesi için gerekli olan proteinlerin fosforilasyonunu sağlar. Siklinler, hücre döngüsünde belirli evrelerde sentezlenerek inaktif formdaki siklin bağımlı kinazlara bağlanır ve bu proteinleri aktive eder (Şekil 3).



Şekil 3. Hücre Siklusunda Siklin ve CDK Aktivitesi

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ise, siklin-siklin bağımlı kinaz aktivitesini denetlemektedir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, CIP/KIP ailesi ve INK 4/ARF ailesidir (Lima & ark., 2017). Bu inhibitörlerin tümör baskılayıcı özellikleri bulunmaktadır. CIP/KIP ailesi p21, p27 ve p57 genlerinden oluşur. Bu proteinler, siklin ve siklin bağımlı kinazları inaktif eder (Rizzolio & ark., 2010). Özellikle, p21' in aktivitesi p53' ün varlığına bağlıdır.

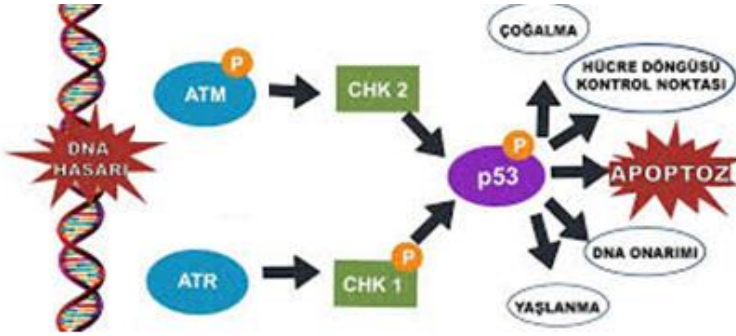
Hasarlı hücrelerde siklusu durdurarak hücreyi programlı hücre ölümüne yönlendiren p53 proteini, kanser hücrelerinin çoğunda mutasyona uğramıştır. INK 4/ARF ailesi ise; p16INK4a, p14ARF, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d proteinlerini kodlar. Bu proteinler de hasarlı hücrelerde siklusu durdurmakta ve tümör baskılayıcı özellik göstermektedir. p16INK4a, siklin bağımlı kinazlara siklinden önce bağlanarak siklusu G1 evresinde durdurur(Zilfou & Lowe, 2009). P14ARF ise p53 ün bozunumunu önleyerek döngüyü durdurur (Şekil 4).



Şekil 4. Hücre Siklusunda INK ve Cip/Kip Ailesi

Kontrol noktalarının çalışabilmesi için DNA hasar yanıtını algılayabilen sensörlere, sinyal yollarına ve onarım mekanizmalarına ihtiyaç vardır. Hasar yanıtında birbiriyle bağlantılı proteinler iş birliği halinde çalışmaktadır (Wynford-Thomas, 1997). Hasar oluştuğunda öncelikle sensörler tarafından bu durum algılanır ve efektör proteinlere hasarın çeşidi ve bulunduğu bölge hakkında bilgi verilir. Efektör proteinler, DNA hasarının tamirini ve siklusun ilerlemesini denetler.

Hücrede DNA hasarı oluştuğunda ATM-CHK2 ve ATR-CHK1 yolları aktive olmaktadır (Şekil 5). DNA hasarı meydana geldiğinde Ataksia Telenjektazi proteini (ATM) ve Ataksiya Telenjektazi- Rad3 ilişkili protein (ATR) aktifleşerek sinyal ileticisi olarak çalışır. Bu proteinler, kontrol noktası kinaz 2 (CHK2) ve kontrol noktası kinaz1 (CHK1)'i aktifleştirir. Bu kinazlar ise hücre siklusu ve DNA hasarının onarımında görevli moleküllerdir. CHK2'nin tümör baskılayıcı fonksiyonu bulunmaktadır (Leong & ark., 2010). Döngünün G1 evresinde DNA hasarı mevcutsa CHK2, CDC25' in inhibisyonuna neden olup siklin/siklin bağımlı kinaz kompleksini inaktive eder. Dolayısıyla, G1/S kontrol noktası aktive olur (Wu & ark., 1997).



Şekil 5. Hücre Siklusunda ATM/CHK2 ve ATR/CHK1 Mekanizması

ATM/CHK2, DNA hasarlandığında H2AX, MRE11-RAD51-NBS1 (MRN) komplekslerini aktifleştirir. CHK2, Homolog Olmayan Son Birleşme (NHEJ) ve homolog rekombinasyon onarımını (HRR) başlatır. NHEJ, HRR' ye göre daha hızlı çalışsa da HRR' nin hata riski çok daha azdır. HRR, sadece S ve G2 evrelerinde

çalışmaktadır ve bunun için DNA işlenmelidir. ATM, HRR için bu görevi üstlenmektedir. (Matsuoka & ark., 2007).

ATR/CHK1, DNA' da çift zincir hasarı oluştuğunda, DNA eşlenmesini durdurur. ATR ve ATR ile etkileşen protein (ATRIP) aracılığı ile tek zincirli DNA' nın onarımını sağlamaktadır (Savic & ark., 2009). ATR, Histon H2AX ve CHK1 gibi birçok kompleksi etkilemektedir. CHK1 ise DNA hasarlandığında transkripsiyonu bloke etmektedir. Ayrıca, bu yolak DNA tamirinin yanı sıra siklusun sürmesini de sağlamaktadır (Salimi, Mozdarani & Majidzadeh, 2012).

Sonuç olarak, Siklin ve CDK'lar hücre döngüsünü kontrol etmektedir. Bu nedenle, hasarlanmaları hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve kanserleşmeye neden olur. Kanser hücrelerinin çoğunda bu moleküller mutasyona uğramış durumdadır. Bu nedenle; siklin, CDK ve CHK' ler kanser tedavisinde hedef moleküller olarak ön plana çıkmaktadır. Yapılan araştırmalarda, siklin D ve E' nin birçok kanser türünde yüksek ifade edildiği görülmüştür (Goto, Izawa & Inagaki, 2012). Ayrıca, CDK inhibitörlerinin mutasyona uğradığı tespit edilmiştir. Özellikle, INK4/ARF ailesi inhibitörler ve p16INK4a mutasyonları pankreas, mesane, baş, boyun, özefagus kanserlerinde öne çıkmaktadır. Mutasyona uğramış p16INK4a proteinleri siklin D-CDK4 kompleksini inaktive etme özelliklerini kaybettiklerinden siklusu durdurmakta başarısız olmaktadır (Lara & ark., 2005).

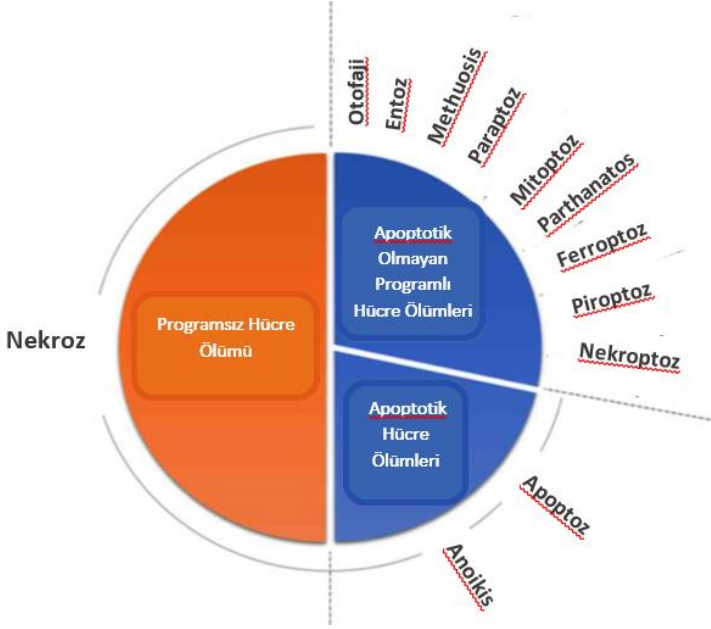
G1/S kontrol noktası ile p53 proteinin ilişkili olduğu bilinmektedir. DNA hasarı meydana geldiğinde p53, G1/S kontrol noktasını aktifleştirerek döngüyü durdurmaktadır. Böylece, DNA

tamir mekanizmasının aktivasyonu için gerekli sinyaller oluşmaktadır. Genellikle kanser hücrelerinde p53 geni mutasyona uğradığı için G1/S kontrol noktası aktiveleşmemektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde apoptozdan kaçma, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve mutasyona uğramış genlerin sonraki hücrelere aktarımı söz konusudur (Batey & ark., 2013).

2.Hücre Ölüm Yolakları

Canlılar; büyüme, gelişme, farklılaşma gibi süreçlerden geçerken homeostazisini de korumak durumdadır. Hücre ölümleri, homeostaziye koruyan ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan önemli bir mekanizmadır. Hücre ölüm yollarının mekanizmalarının anlaşılması başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için umut vaat etmektedir (Danial & Korsmeyer, 2004).

Hücre ölüm yollarının farklı çeşitleri bulunmaktadır. Bu yollar, programlı ve programsız hücre ölümü olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. Hücre Ölüm Yolakları

2.1. Programlı Hücre Ölüm Yolakları

Programlı hücre ölümünde birbiri ile bağlantılı sinyal yolakları bulunmaktadır. Programlı hücre ölüm yolakları apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölümü şeklinde sınıflandırılmaktadır. Apoptoz ve anoikis apoptotik hücre ölüm yolaklarıdır. Otofaji, entoz, mitoptoz, ferroptoz, piroptoz, nekroptoz, paraptoz, methuosis, parthanatos, anoikis ise apoptotik olmayan hücre ölüm yolaklarıdır (Lamy & ark., 2013).

2.1.1. Apoptoz

Çok hücreli canlılarda embriyonik dönemden itibaren apoptotik ölüm yolağı işlevseldir. Bu yolak doku ve organların şekillenmesi, hasarlı hücrelerin yok edilmesi gibi metabolik olaylarla canlının homeostazisinin korunmasını sağlar. Apoptotik

hücre ölümü, hasarlı DNA' ya sahip hücreleri yok eden ve enfeksiyonlara karşı savaşan bir yolak olup ileride kanserleşip metastaz yapabilecek hücrelerin yok edilmesi açısından önemlidir. Kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz mekanizması bozulmuş durumda olup hasarlı hücrelerin anormal çoğalması görülmektedir (Berthelet & Dubrez, 2013).

Apoptoz mekanizması hasarlı hücreleri yok ettiği için kanser oluşumunu engelleyen en önemli silahlardan biridir. Hücrelerin apoptoza girme yeteneğinin kaybolması kanserin en önemli belirtisidir. Hücrelerin apoptozdan kaçması yalnızca kanser gelişimi değil, aynı zamanda ilerlemesi ve tedaviye direnç oluşturmalarına da neden olur (Bose, 2013). Bu nedenle, kanser tedavisinde hücrelerin apoptoz yeteneğinin yeniden kazandırılması hedeflenmektedir.

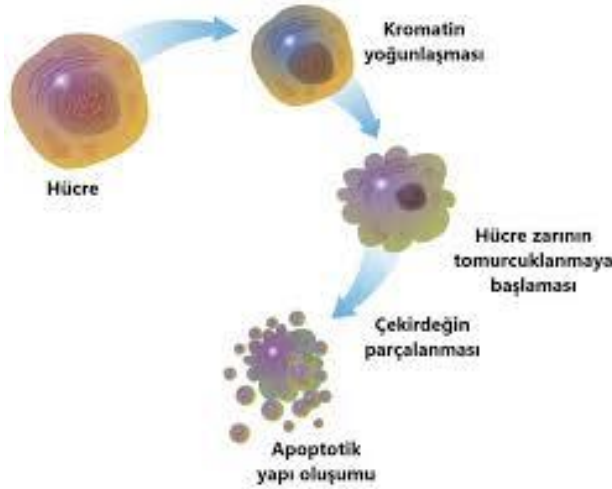
Yapılan araştırmalarda, kanser hücrelerinde Bcl-2 ve Bcl-xl ifadesinin arttığı, Bax ve Bcl-Xs gibi proapoptotik proteinlerdeki dengesizliklerin tümör oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir. Ayrıca, bazı kanser türlerinde kaspaz 8 ifadesinin olmadığı ve intrinsik yolda Apaf-1' in ifadesinin azaldığı görülmüştür (Fulda & Meyer, 2000).

2.1.1.1. Apoptoz Morfolojisi

Apoptotik hücrelerde morfolojik olarak sitoplazma miktarının azalıp yoğunluğunun artması, hücrenin büzüşmesi, organellerin kaybolması ve DNA' nın parçalanması gözlenmektedir. Hücre komşu hücrelerden bağımsız hale gelmekte ve piknotik bir görüntüye kavuşmaktadır (Lockshin & Zakeri, 2001). Ardından nükleus parçalanıp membranla çevrili apoptotik cisimcikleri oluşturmaktadır. Makrofajlar ise fagositozla apoptotik cisimcikleri yok etmektedir (Şekil 7). Apoptozun diğer önemli özelliklerinden

biri yangısal tepkiye neden olmamasıdır. Bu durum, hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa yayılmayıp diğer hücreleri etkilememesinin bir sonucudur (Wong, 2011).

Apoptotik hücre ölümünde bazı biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişikliklerden bazıları kaspaz mekanizmasının aktive olması, DNA' nın parçalanması, plazma zarında bulunan fosfatidilserinin zarın dışına aktarımı ve mitokondri dış zarının bozunması nedeniyle sitokrom c' nin sitoplazmaya geçişidir. Fosfatidilserinin zarın dışına aktarımı bağışıklıkta görevli hücreleri uyarak fagositozun gerçekleşmesini sağlamaktadır (Saraste & Pulkki, 2010).

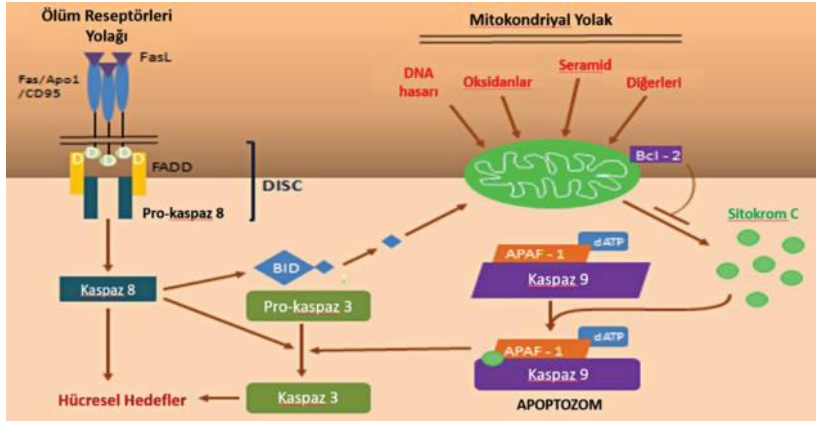


Şekil 7. Apoptoz Morfolojisi

2.1.1.2 Apoptozun İndüklenmesi

Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki farklı mekanizma yolu ile gerçekleşebilmektedir. İki mekanizmada da

kaspazlar işlevseldir, fakat bu kaspazlar farklı yollarla hücre ölümünü başlatmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Apoptozda İntrinsik ve Ekstrinsik Yolak

2.1.1.3. İntrinsik Yolak

İntrinsik yol, mitokondriyal apoptoz olarak da adlandırılmaktadır. DNA hasarı, serbest radikaller, hücre bölünmesi sırasında meydana gelen hatalar intrinsik apoptoza neden olabilmektedir. İntrinsik yolda kaspaz 9 aktive olur ve mitokondriyal proteinler işlev görür. BAX, BAK gibi Bcl2 proteinleri mitokondrinin dış zarındaki APAF1'e bağlı bulunur (Green, 2018). Bax ve Bak, hücre hasarlandığında mitokondri dış zarını etkileyerek apoptozu tetikler ve APAF1 Bcl 2' den ayrılır. Bunun sonucunda, elektron taşıma sisteminde görevli sitokrom c gibi maddelerin sitoplazmaya aktarımını sağlar. Sitokrom c, prokaspaz 9 u aktive eder. Sitokrom c, kaspaz 9 ve APAF birleşerek apoptozom oluşturur. Apoptozom; kaspaz 3 ü aktive ederek kaspaz şelalesini başlatır. Kaspaz 6 ve 7, aktive olur. Kaspaz 3,6 ve 7, organelleri parçalar (Adamkov, 2019). Ayrıca, endoplazmik

retikulumun zar geçirgenliğini artırır ve mitokondri ile arasındaki kalsiyum transferini sağlar. Bunun sonucunda, intrinsik apoptoz gerçekleşir.

2.1.1.4. Ekstrinsik Yolak

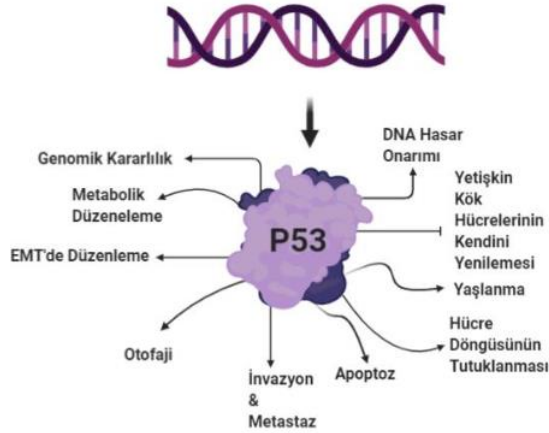
Ekstrinsik yolda hücre ölüm reseptörleri görev alır. Ekstrinsik apoptozda hücre ölüm reseptörü Fas, tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1), kaspaz 8 ve 10 rol oynamaktadır. Ekstrinsik apoptozun başlaması ölüm reseptörleri olan TNFR-1 ve Fas' ın reseptörlere bağlanması ile gerçekleşir. Bunun sonucunda, prokaspaz 8 ve prokaspaz 10 aktive olur (Kim-Campbell, Gomez & Bayir, 2019). Kaspaz 8, Bid' i aktive ederek sitokrom c' nin salınımına neden olur ve apoptozom oluşumu gerçekleşir. Ardından, kaspaz 3 ve diğerkaspazlar aktive olarak ekstrinsik yolağı gerçekleştirir. Kaspazların aktive olması nükleazların DNA' yı parçalaması, zarın deforme edilmesi, apoptotik cisimlerin oluşması ve fagositozun gerçekleşmesine neden olur (Susan & Brad, 2005).

2.1.1.5. p53' ün apoptozdaki önemi

P53, tümör baskılayıcı bir gen olup hücre döngüsünü G1 evresinde durdurarak hasarın tamir edilmesini ya da bunun mümkün olmadığı durumlarda apoptozu tetiklemektedir. Kanserk hücrelerinin çoğunda p53 mutasyona uğramıştır. Mutasyona uğramış p53, hücrenin kanserleşmesine neden olabilmektedir. Bundan dolayı, hasarlı hücrelerin kontrolsüz çoğalması söz konusu olmaktadır (Safta & ark., 2015). Mutasyona uğramamış hücrelerde ise p53 geninin kaybı görölmektedir (Şekil 9).

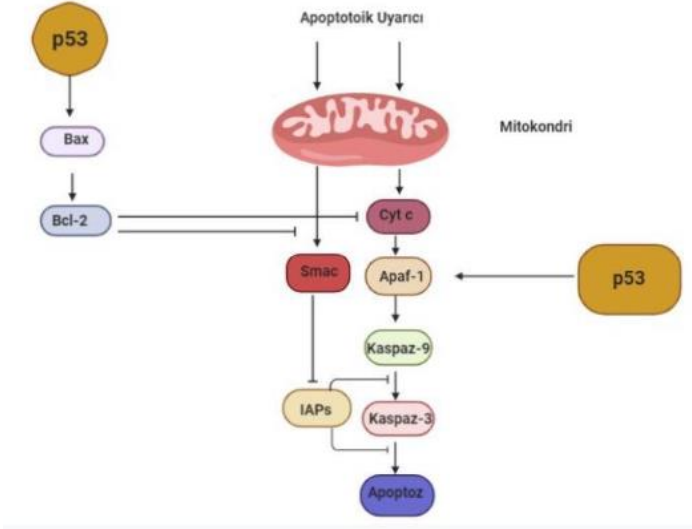
Yapılan çalışmalarda p53 genine sahip kanser hücrelerinde kemoterapi sonrası yaşlanmanın göröldüğü, p53' e sahip olmayan

kanser hücrelerinde ise kemoterapi sonrası hücrelerin yaşlanmak yerine öldüğü belirlenmiştir (Sobhani & ark., 2020).



Şekil 9. Apoptozda p53' ün Rolü

p53 geni, intrinsik ve ekstrinsik apoptozda rol oynamaktadır. Apoptozu baskılayan Bcl2' yi inhibe ederek Bax genini aktive etmektedir. Böylece, sitokrom c sitoplazmaya geçerek apoptozu başlatmaktadır (Şekil 10). Ayrıca, p53, p21 sentezini sağlamaktadır. İfadesi artan p21, siklin bağımlı kinaz 2 ile etkileşerek siklusu durdurmaktadır. Böylece, hücre G1 kontrol noktasından S evresine geçememektedir (Levine & Oren, 2009).



Şekil 10. p53 Mekanizması

2.1.1.6. Kaspazların Apoptozdaki Rolü

Apoptozda görevli olan kaspazlar, normalde inaktif halde olup apoptoz sırasında aktifleşmektedir. Kaspazlar sistein içermekte ve proteaz olarak da görev almaktadır (Riedl & Shi, 2004).

Kaspazlar, yapısal ve fonksiyonel olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Kinazlar ve hücre iskeleti elemanlar yapısal kaspazları oluşturmaktadır. Fonksiyonel kaspazlar ise bağışıklıkta görevli hücrelerin aktivasyonu, proteinlerin çapraz bağlanması ve diğer kaspazları uyarmakta görevlidir (Tomes, 2003).

Kanser tedavisinde hücrelerde apoptoz hedeflenirken kaspaz yolları da dolaylı olarak etkilenmektedir. Yeni tedavi yöntemlerinde ise, kaspaz inhibitörleri baskılanarak kaspazların ekspresyonunun artırılması hedeflenmektedir.

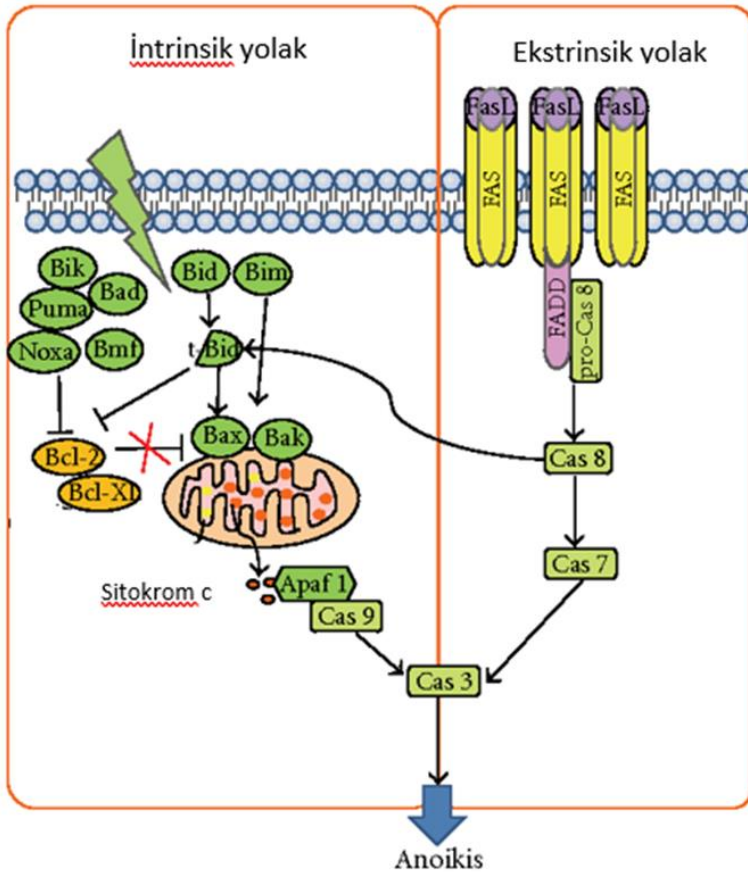
2.1.2. Anoikis

Yunanca 'evsizlik' kelimesinden gelen Anoikis, hücrelerin birbirine tutunamaması nedeniyle oluşan özel bir apoptotik ölümdür. Anoikis, benzersiz tanımına rağmen aslında apoptotik bir süreçtir. Hücrenin, hücre dışı matriks proteinlerine yapışması hücrenin doğru konumda olup olmadığının belirlenmesi için gereklidir (Kim & ark., 2012). Anoikis sırasında evsizleşen hücrelerin matrislere yeniden bağlanmaları ve displastik büyümeleri önlenir. Anoikis'in başlatılması ve yürütülmesi, kaspazların aktivasyonuna ve DNA fragmentasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Klasik apoptoza uygun olarak anoikis, mitokondrinin bozulması nedeniyle intrinsik veya hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri tarafından tetiklenen ekstrinsik yolu izleyebilir (Simpson, Anyiwe & Schimmer, 2008).

İntrinsik yolda kaspaz aktivasyonu, dış mitokondriyal membranda (OMM) oligomerlerin oluşması nedeniyle mitokondriyal geçirgenliğin artışı sonucu meydana gelir. Böylece kanallar oluşturularak membran geçirgenliği artar (Taddei & ark., 2012). OMM'nin bozulması, sitokrom c'nin salınmasına yol açar. Kaspaz-9 ve apoptoz proteaz aktive edici faktör (APAF) aracılığıyla 'apoptozom' oluşur. Ardından efektör kaspaz-3'ün aktivasyonu ile apoptoz gerçekleşir.

Ekstrinsik yolak, Fas Ligandı (FasL) veya tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) gibi hücre dışı ölüm ligandlarının, transmembran reseptörleri olan Fas ve TNF-a' ya (TNFR) bağlanmasıyla başlatılır ve bunun sonucunda hücre ölümüne neden olan sinyal kompleksi oluşur (DISC). DISC, Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) aracılığıyla, prokaspaz-8' i aktive eder (Malagobadan, Ho & Nagoor, 2020).

Kaspaz-8 ise kaspaz-3 ve -7'yi proteolitik olarak aktive eder. Bunun sonucunda substrat proteolizi ve hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 11).



Şekil 11. Anokis Mekanizması

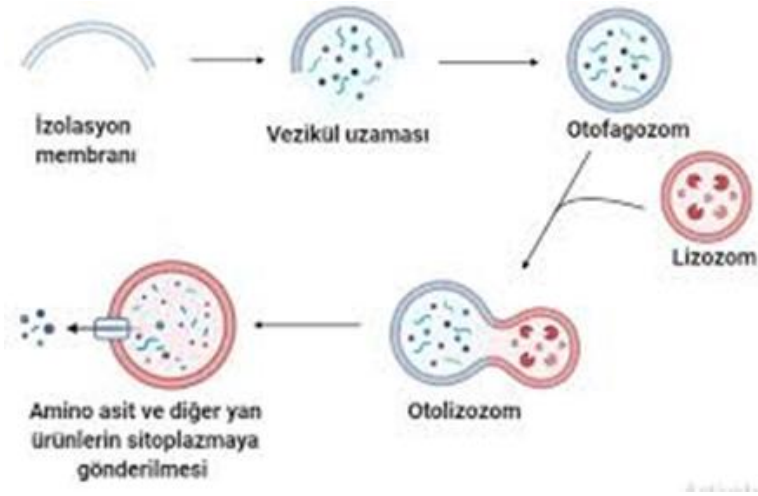
Sağlıklı hücrelerde hücreler arası matriks bağlantısının kopması anokisi tetiklemektedir. Fakat, kanser hücrelerinde anokise karşı direnç geliştirilebilmektedir. Kanser hücrelerinde anokise karşı geliştirilen direnç metastaz yeteneklerini artırmaktadır. Metastaz yeteneği artan kanser hücreleri uzak

dokularda kolonileşebilmektedir (Flores-Peredo, Rodriguez, & Zarain-Herzberg, 2017).

2.1.3. Otofaji

Otofaji, programlı bir hücre ölüm çeşidi olup organellerin ve polimerlerin zar içerisinde lizozomla birleşerek parçalanmasıdır. Parçalanma sonucu oluşan monomerler, hücre içinde yeniden kullanılabilir. İlk araştırmalarda otofajinin hücrenin olumsuz koşullarda hayatta kalmak ve besin elde etmek için tercih edilen bir yol olduğu ortaya çıkarılmıştır (Kim & ark., 2011). Sonraki çalışmalarda ise, otofajinin homeostazi, farklılaşma, hücre savunması, yaşlanma ve hücre ölümünde etkili olduğu gösterilmiştir.

Otofaji, kaspaz bağımsız bir programlı hücre ölüm çeşididir. Bu yolakta kromatin iplikler dağınıktır, membran genişler, makromoleküller parçalanır ve kesecikler oluşur. Protein ve enzimler, lizozom aracılığıyla kesecikler içerisinde parçalandığı için hücre zarar görmez (Aburto, 2012). Otofaji anomalileri kanser, sinir sisteminde hasarlanma, gelişimsel bozukluklarına neden olmaktadır (Şekil 12).

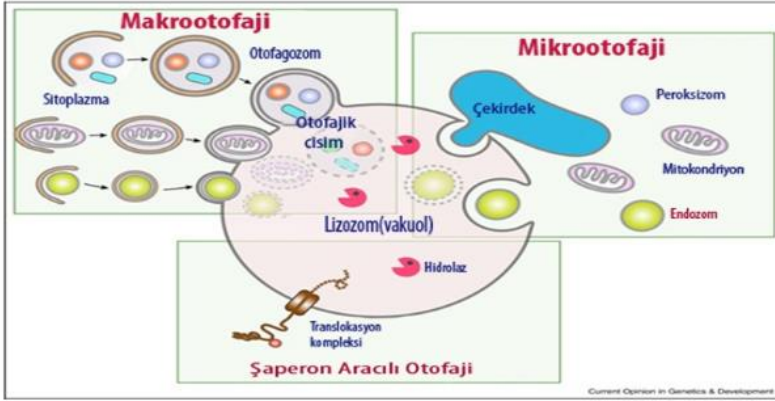


Şekil 12. Otofaji Morfolojisi

Otofaji mekanizmasında bazı tümör baskılayıcı genler ve birtakım onkogenlerin de işlevsel olduğu belirlenmiştir. Örneğin, DAPk protein kinazın kanser hücrelerindeki yukarı regülasyonu otofajiyi tetikleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır (Axe & ark., 2008). Yapılan çalışmalarda DAPk' nin apoptoz ve otofajiyi birden fazla yolakla düzenlediği belirlenmiştir. Ayrıca DAPk protein kinaz, bazı onkogenlerin p53' ü aktive etmesi için önemli rol oynamaktadır.

Otofajinin makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji gibi çeşitleri bulunmaktadır. Makrotofaji, makromoleküllerin ve organellerin yıkımında oldukça önemlidir. İzole için oluşan zar, parçalanacak yapıları çevreler ve otofagozom oluşur (Suzuki & ark., 2007). Otofagozomda tutulan yapılar lizozomla birleşir. Mikrotofajide özellikle lizozom aktivitesi ön plandadır. Lizozomal zar, invajinasyon yoluyla yayılıp organeller ve sitozol içeriğini parçalar (Bento & ark., 2016). Şaperon aracılı

otofajide ise yanlış katlanmış proteinler şaperonlar aracılığı ile lizozoma yönlendirilir (Şekil 13).



Şekil 13. Otofaji Yolakları

2.1.4. Entoz

Entozda bir hücre başka bir hücre tarafından istila edilmektedir. Bunun sonucunda istila edilen hücre konakçı hücreyi sindirir. Bu yolla, fagozom oluşumu gerçekleşir ve hücre lizozom tarafından parçalanır. Entozun gerçekleşebilmesi için iki hücrenin de aynı tür olması gerekmektedir (Kisurina-Evgenieva & ark., 2019). Bazı durumlarda ise yutulan hücre, diğer hücrenin içinde bölünüp hücre dışına çıkabilir.

Başlangıçta entozun tümör süpresör etkisi olduğu varsayılsa da çeşitli incelemeler sonucunda kanser hücrelerinde çok sayıda entotik figüre rastlanmıştır. Ayrıca, kanser tedavisinde kullanılan bazı kemoterapötik ilaçların entozu tetiklediği gösterilmiştir (Garanina & ark., 2017). Kanser tedavisinde entotik hücre olumsuz faktörlerden kaçıp konakçı hücreyi sağlam bırakarak kanserin yayılmasına ve tedavinin başarısız olmasına sebep olabilir. Bu

nedenle, entoz kanser hücrelerinde proliferasyonu artırmakta ve tümörün ilerlemesine neden olabilmektedir (Kroemer & Perfettini, 2014). Bu durum, kanser tedavisinin başarısız olmasına ve kanserin nüksetmesi ile ilişkilendirilmektedir.

2.1.5. Mitoptoz

Mitoptoz, mitokondriyal ölüm yolağıdır. Bu ölüm yolağında mitokondri programlanmış bir şekilde bozunuma uğrar. Mitoptotik cisimcik ya da otofagozom oluşumu görülür. Mitoptoz bir hücre ölüm yolağı olmamasına rağmen mitokondriyal fisyon hücre ölümüne sebep olur (Skulachev, 2006.).

2.1.6. Ferroptoz

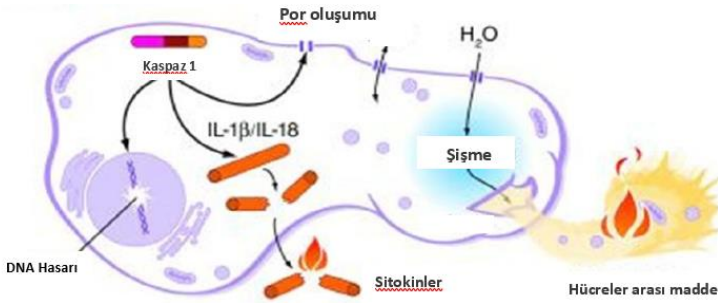
Ferroptozda, demir bağımlı lipid peroksit birikimi söz konusudur. Bu yolakta, kalıtsal madde yoğunlaşmaz ve nukleusta morfolojik bir değişiklik meydana gelmez. Ayrıca, hücre zarında bozulma gerçekleşmez (Dixon & ark., 2012). Fakat; hücrenin hacmi azalır, mitokondrinin zar yoğunluğu artar, mitokondrinin iç zarı büzüşür ve mitokondri küçülür.

Kanser hücrelerinde serbest radikallerin ve demir metabolizması sonucu oluşan lipid peroksidasyon moleküllerinin birikimi, protein kinazların aktivasyonunu ve endoplazmik retikulum stresini artırarak ferroptozu tetiklemektedir (Eling & ark., 2015). Buna bağlı olarak, yapılan çalışmalarda ferroptozu indükleyen bazı ilaçlar geliştirilmektedir.

2.1.7. Piroptoz

Piroptoz, inflamasyon ile kendini gösteren programlı bir hücre ölüm yolağıdır. Mikroorganizmalar tarafından enfekte olmuş bağıışıklık hücrelerinde ve inflamatuvar hastalıklar kaynaklı hücre

ölümlerinde görülür (Xia & ark., 2019). Piroptoz morfolojisi nukleus yoğunlaşması, kaspaz bağımlılığı ve DNA kırılması gibi yönleriyle apoptoza benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda piropozun Gasdermin D proteinleri (GSDMD), tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir. GSDMD, membran zarında porlar oluşturarak inflamatuvar sitokin salgılanmasına neden olur (Shi & ark., 2015). Sitokin salınımı, zar bütünlüğüne zarar vererek piropoz ve enflamasyona neden olur (Şekil 14). Aynı zamanda inflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5 ve kaspaz 11) ve apoptotik kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 8) da piropozda önemli rol oynamaktadır (Sollberger & ark., 2014).



Şekil 14. Piroptoz Mekanizması

Piroptoz, kanonik yolak ve kanonik olmayan yolak olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir. Kanonik yolak kaspaz 1 bağımlı olarak gerçekleşirken kanonik olmayan yolak kaspaz 4-5 ve 11 aracılı gerçekleşmektedir.

Kanonik yolakta inflamozom ve kaspaz 1 aktivasyonu görülür. Mikroorganizmalara karşı enflamasyonu başlatan ve kaspaz 1 aktivesini düzenleyen bağışıklık sistemi elemanlarına inflamozom denmektedir (Franchi & ark., 2006). Kaspaz 1, bağışıklık sistemi

aktivasyonu için oldukça önemlidir. Aktive olan kaspaz 1, GSDMD' yi böler, ardından interlökin salınımı görülür. İnterlökin, akyuvarlar tarafından üretilen bir sitokin grubudur.

Kanonik olmayan yolda kaspaz 4-5 ve 11 aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz 4-5 ve 11, kaspaz 1 gibi GSDMD' yi bölerek membran zarında por oluşumu gerçekleştirmektedir (Aglietti & ark., 2016).

Ayrıca, apoptotik kaspazlar olan kaspaz 3-6 ve 8 de GSDM' yi bölerek piroptozu tetikleyebilir. Kaspaz 3, GSDME' ye bağımlı piroptozu başlatırken kaspaz 8, GSDMD' ye bağımlı piroptozu neden olur (Sborgi & ark., 2016). Kaspaz 6 ise kaspaz 1 aracılı sinyalizasyonu aktifleştirerek piroptoz yolağını düzenler.

Piroptoz yolağı; farklı kanser türlerinde hücre ölümünü uyarır, proliferasyon ve metastazı önler. Ayrıca, bazı kanser türlerinde piroptozla ilişkili proteinlerin ifadesi azalmıştır. Bu nedenle, kanser tedavisinde piroptoz yolağının hedeflenmesi tedavi etkinliğini artırabilir (Hachim & ark., 2020).

2.1.8. Nekroptoz

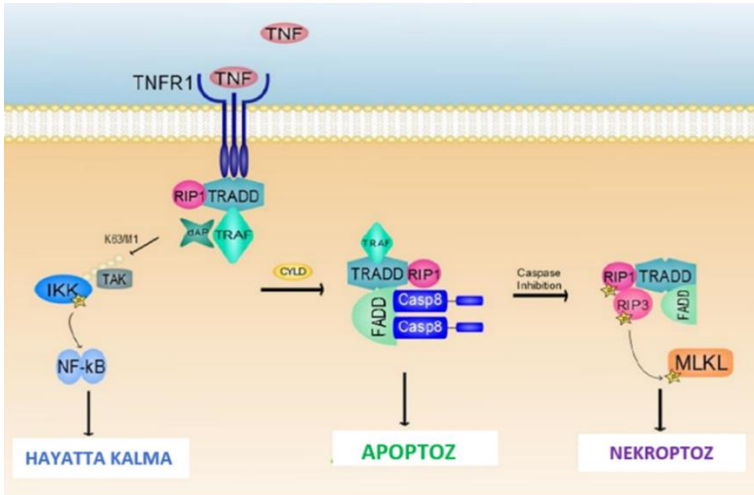
Nekroptoz, hücre içi veya dışarısında anomaliler meydana geldiğinde görülen programlı nekrozdur. Çok sayıda sinyal yolağı aracılığı sonucu reseptör etkileşimli protein kinaz aktivasyonu gerçekleşir (He & ark., 2009). Nekrozomun ana proteinleri olan RIPK1 ve RIPK3, reseptör etkileşimli protein kinazlar tarafından aktive edilir. Morfolojik olarak görülen membran yırtılması ve organel kaybı yönüyle nekroza benzer (Cho & ark., 2009).

Nekroptoz; TNF ailesi reseptörleri, TLR3, TLR4 ve interferon reseptörleri tarafından başlatılabilmektedir. Nekroptoz üç

kategoriye ayrılmaktadır. Ekstrinsik nekroptoz, TNFa tarafından uyarılırken intrinsik nekroptoz, reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından uyarılmaktadır (Murphy & ark., 2013). Ayrıca, iskemi aracılı intrinsik nekroptoz şeklinde de gerçekleşebilmektedir. TNFa aracılı nekroptoz; TRADD, FADD, RIPK1, TRAF2/TRAFF5 ve cIAP1/cIAP2'yi içeren kısa ömürlü membran sinyal kompleksinin (kompleks I olarak bilinir) oluşumuna yol açan klasik bir nekroptozdur. TRADD, RIPK1'i TNFR1'e bağlayan bir adaptör moleküldür (Sedger & McDermott, 2014). Daha sonra cIAP'ler ve TRAF2/3/5 kompleks I' e dahil edilmektedir. Aktivasyon üzerine cIAP1/2 ve TRAF2/5, RIPK1'in yaygınlaşmasına aracılık etmekte ve stabil kompleks I' in oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bunun sonucunda, NF-κB- ve MAPK aracılı yolu içeren hücre hayatta kalma yolu ile sonuçlanan alternatif yolu başlatmaktadır (Kalliolias & Ivashkiv, 2016). NF-κB sinyalleme, TNFa' nın sitotoksik etkisine karşı koymada anahtar bir rol oynamakta ve NF-κB'nin hayatta kalma etkisine cIAP1/2 ve cFLIP (hücreSEL FLICE benzeri inhibitör protein) aracılık etmektedir. Bu nedenle kompleks I, hücrenin hayatta kalması ve nekroptoz için çok önemli bir kontrol noktasıdır (Kaczmarek, Vandenabeele & Krysko, 2013).

Nekroptozda Kaspaz-8' in inhibisyonu, RIPK1'in aktivasyonuna yol açar. Böylece, kompleks I' in stabilitesi bozulur. Ubikuitin zincirinin RIPK1' den çıkarılması; bunun FADD, TRADD, RIPK3 ve kaspaz ile etkileşimine yol açarak kompleks II' nin oluşumuyla sonuçlanır (Moriwaki & Chan, 2016). RIPK1, reseptör homoloji alanı (RHD) yoluyla RIPK3 ile etkileşime girerek nekrozom oluşumuna yol açar ve bu da nekroptoz ile sonuçlanan aşağı akış sinyalini daha da başlatır (Şekil 15). Nekroptozun

indüksiyonu için hem RIPK3 hem de RIPK1 gerekli olmasına rağmen, RIPK3 hücrelerde aşırı eksprese edildiğinde tek başına nekroptozu destekleyebilir (Duprez & ark., 2011). Aktivasyon üzerine RIPK3, nekroptozun indüklenmesinde anahtar rol oynayan psödokinaz MLKL'yi (karışık soy kinaz alanı benzeri protein) fosforile eder (Han, Zhong & Zhang, 2011). MLKL iki şekilde etki eder: Na^+ iyonu ya da Ca^{++} kanallarının toplanması için plazma zarında platform görevi görür ya da fosfatidil inositol fosfatın amino terminali ile etkileşime girerek plazma zarında gözenek oluşumunu destekler (Man & ark., 2013).



Şekil 15. Hücrede Apoptoz ve Nekroptoz Mekanizması

Yapılan çalışmalarda nekroptozun, apoptoz mekanizması bozulmuş kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, son yıllarda kanser tedavisinde nekroptozu hedeflemek oldukça dikkat çekmektedir (Xuan & Hu, 2009).

2.1.9. Paraptoz

Paraptoz, kaspaz bağımsız programlı bir hücre ölüm yolağıdır. Paraptozun gerçekleşmesi için MAP kinaz aktivasyonu gereklidir. Bu yolak, endoplazmik retikulum ve mitokondri zarının genişlemesini içeren geniş sitoplazmik vakuolasyon ile karakterizedir (Yokoi & ark., 2022). Paraptozun, İnsülin Büyüme Faktörü 1 Reseptörünün (IGF1R) ekspresyonu, proteazom inhibisyonu, endoplazmik retikulum stresi, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, mitokondriye kalsiyum akışı ve iyon kanallarının açılması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla indüklendiği rapor edilmiştir (Lee & ark., 2022).

Apoptozdan farklı olarak paraptoz, kaspazların aktivasyonunu veya apoptotik cisimciklerin oluşumunu içermez ve kaspaz inhibitörlerinden veya Bcl-2 benzeri anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonundan etkilenmez (Lee & ark., 2017). Öte yandan paraptozun, mitojenle aktiveleşen protein kinaz 2 (MEK-2), c-Jun N-terminal protein kinaz 1 (JNK1) gibi mitojenle aktiveleşen protein kinaz (MAPK) ailesi üyelerine bağlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 16).



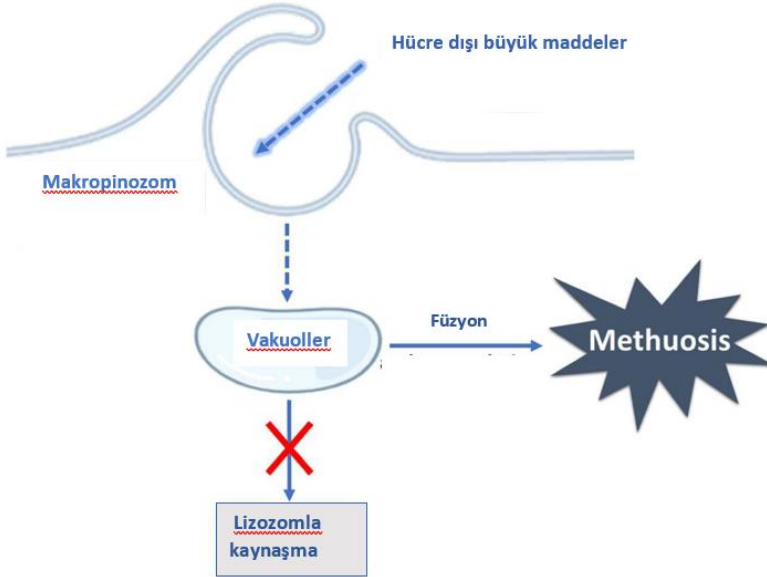
Şekil 16. Hücrede Paraptosis Mekanizması

Kanser hücrelerinde paraptoz mekanizmasının bozulması; ilaç direnci, anjiyogenez, proliferasyon, metastaz yeteneğinde artışa neden olabilir (Petrillo & ark., 2018). Buna bağlı olarak, kanser hücrelerinde paraptozisin hedeflenmesi tedavi etkinliğini artırma potansiyeline sahip olup klinik olarak araştırılmaktadır (Zhu & ark., 2019).

2.1.10. Methuosis

Methuosisin en önemli özelliği, hücrenin makropinozomlar yoluyla çok fazla büyük sıvı dolu vakuoller oluşturmasıdır. Makropinozomlar lizozomlarla kaynaşmaz, fakat birbirleriyle kaynaşarak dev vakuoller oluştururlar (Maltese & Overmeyer, 2014). Bu durum, plazma zarının yırtılmasına neden olur. Hücre ölümü sırasında hücre büzülmesi ve nükleer parçalanma olmaz. Zar bütünlüğünün kaybolması yönüyle nekroza benzemektedir (Overmeyer & ark., 2011). Methuosis, makropinozomlardan türetilen sitoplazmik vakuollerin birikmesi, ardından metabolik yetmezlik ve plazma zarının yırtılması ile karakterize edilir (Şekil 17).

Kanser tedavisinde, makropinozomlar tarafından alınabilen maddelerin üretilmesi hücre içi molekülleri hedefleme için umut vaat edebilir (Cho & ark., 2018). Benzer şekilde, hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanabilen ve makropinozomlarla hücreye alınabilen nanopartiküller gibi ilaç taşıyıcılarının geliştirilmesi terapötik açıdan olumlu sonuçlar doğurabilir (Trabbic & ark., 2014).



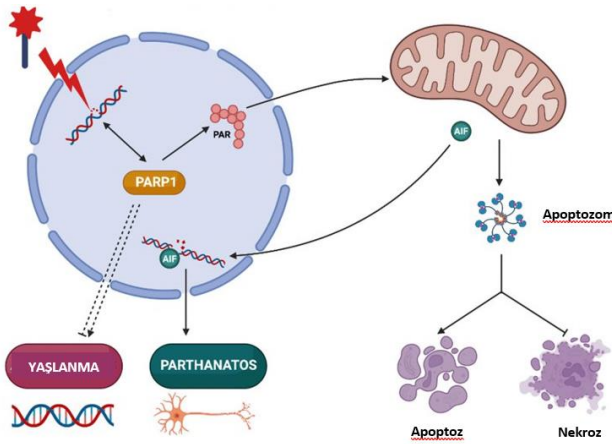
Şekil 17. Hücrede Methuosis Mekanizması

2.1.11. Parthanatos

Parthanatos, PARP1 tarafından aşırı üretimi ile karakterize edilir. PAR polimerinin mitokondriden çekirdeğe translokasyonunu indükleyerek PARP-1 aracılı hücre ölümünün temelini oluşturur. Parthanatos, bazı morfolojik özellikleri paylaşmasına rağmen apoptoz ve nekrozdan ayrıdır. Bu yol kaspazdan bağımsızdır, bu da onu apoptozdan farklı kılar (Andrabi, Dawson & Dawson, 2008). Ancak 2007'de "parthanatos" keşfedilmeden önce yaygın olarak apoptozun kaspazdan bağımsız bir formu olarak anılırdı. Benzer şekilde parthanatos, membran bütünlüğünün kaybı ve hücresel enerji depolarının tükenmesi gibi nekrozla örtüşen özelliklere sahiptir (David & ark., 2019). Bununla birlikte, kanonik nekrozdan farklı olarak, parthanatos tarafından ölen hücreler, hücre zarlarında şişme

ve yırtılma olmaksızın, düzenlenmiş bir süreç olarak kromatinolize uğrar (Şekil 18).

Bazı kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, parthanatosun gerçekleştiği hastaların hayatta kalma oranlarının parthanatosun gerçekleşmediği hastaların hayatta kalma oranlarına göre istatistiki olarak olumlu olduğu belirlenmiştir (Kong & ark., 2017). Bu sonuçlar, kanser tedavisinde parthanatos aktivitesinin uyarılmasının olumlu bir etkisinin olabileceğini göstermektedir (Liu, Luo & Wang, 2021).



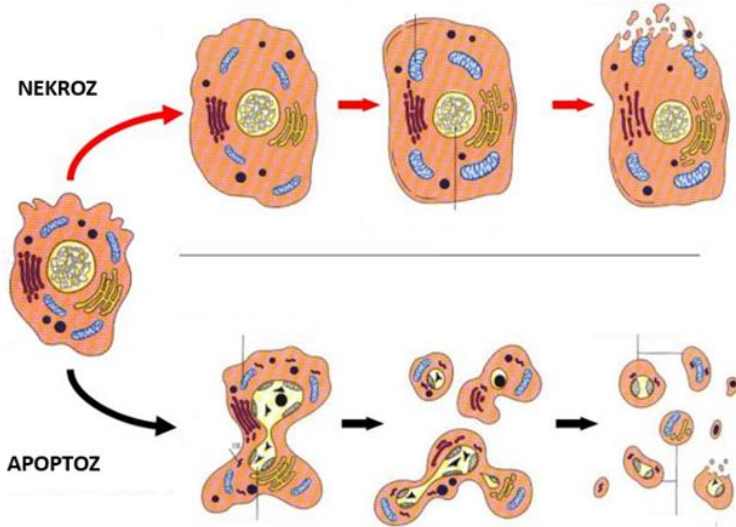
Şekil 18. Parthanatos, Apoptoz ve Nekroz Mekanizması

2.2. Programsız Hücre Ölümü: Nekroz

Hücresinin aniden hasarlanması durumunda programlanmamış hücre ölümü olan nekroz meydana gelir. Hipoksi, ağır metaller, kimyasal maddeler, radyasyon, hasarlanma, enfeksiyon gibi faktörler nekroza sebep olabilir. Ciddi şekilde hasarlanan ve onarımı mümkün olmayan hücrede, rastgele ve gen kontrolünden bağımsız bir ölüm yolağı olan nekroz gelişir (Golstein & Kroemer, 2007).

Nekrozda hücre zarı parçalanır ve hücre içeriği hücre dışı bölgeye yayılıp enflamasyon ve doku hasarına neden olur. Nekrozda mitokondride serbest radikal oluşumu görülür, apoptotik olmayan proteazlar aktive olur, kalsiyum geçirgenliği artar (Nicotera, Bernassola & Melino, 2004).

Nekroz sırasında hasarlanan hücrenin iyon dengesi bozulur. PARP (Poli ADP-riboz polimeraz), oksidatif fosforilasyonda görevli olan NAD^+ 'ı bölerek NAD miktarının azalmasına sebep olur. Bundan dolayı yeteri kadar ATP sentezlenemez ve iyonlar aktif taşıma ile dışarı atılamaz. Hücre aşırı derecede sıvı alarak şişer ve hemolize uğrar (Warny & ark., 2000). Hücre içeriği hücreler arası bölgeye yayılır. Bu durum, enflamasyona ve doku hasarına neden olur (Şekil 19). Bağışıklıkta görevli hücreler, nekrotik bölgeye göç ederek fagositoz gerçekleştirir (Shimizu & ark., 2000).



Şekil 19. Apoptoz ve Nekroz Morfolojisinin Karşılaştırılması

Yapılan çalışmalarda nekroz sonucu hücreler arası bölgeye yayılan içeriğin kanser hücrelerinin hayatta kalma şansını, anjiyogenezi ve metastaz yapma yeteneğini artırdığı ortaya çıkarılmıştır (Fink, Susan & Brad, 2005). Bu nedenle, nekroz sonucu yayılan faktörlerin hedeflenmesinin kanser tedavisinde hayatta kalma başarısını artırabileceği düşünülmektedir.

Teşekkür: Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü olanakları kullanılarak doktora tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiştir

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2020-36922 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

...

Referanslar

Aburto, MR., Hurlé, JM., Varela-Nieto, I. & Magariños, M. (2012) Autophagy during vertebrate development. *Cell*, 1:428–448.

Adamkov, M. (2019) Logical complexity of Bcl-2 family proteins function in the intrinsic apoptosis. *Srp Arh Celok Lek*, 147:98-104.

Aglietti, RA., Estevez, A., Gupta, A., Ramirez, MG., Liu, PS. & Kayagaki, N. (2016) GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(28):7858-63.

Andrabi, SA., Dawson, TM. & Dawson, VL. (2008) Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci*, 1147:233–241.

Axe, EL., Walker, SA. & Manifava, M. (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3- phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 182:685– 701.

Batey, MA., Zhao, Y., Kyle, S., Richardson, C., Slade, A., Martin, NM., Lau, A., Newell, DR. & Curtin, NJ. (2013) Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. *Mol Cancer Ther*, 12:959–67.

Bento, CF., Renna, M. & Ghislat, G. (2016) Mammalian autophagy: How does it work? *Annu Rev Biochem*, 85:685–713.

Berthelet, J. & Dubrez, L. (2013). Regulation of apoptosis by inhibitors of apoptosis (IAPs). *Cells*, 2, 163-87.

Bogdan, AR., Miyazawa, M., Hashimoto, K. & Tsuji, Y. (2016) Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem Sci*, 41: 274–86.

Bose, K. (2015) Proteases in apoptosis: Pathways, protocols and translational advances. Springer, 1–237.

Chiong, M., Wang, ZV., Pedrozo, Z., Cao, DJ., Troncoso, R., Ibacache, M., Criollo, A., Nemchenko, A., Hill, JA. & Lavandero, S. (2011) Cardiomyocyte death: Mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis*, 2: e24.

Cho, H., Geno, E., Patoor, M., Reid, A., McDonald, R., Hild, M. & Jenkins, JL. (2018) Indolyl-Pyridinyl-Propenone-Induced Methuosis through the Inhibition of PIKfyve. *ACS Omega*, 3, 6097–6103.

Cho, Y., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, TD., Guildford, M. & Chan, FK. (2009) Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137:1112–23.

Danial, NN. & Korsmeyer, SJ. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205–19.

David, KK., Andrabi, SA., Dawson, TM. & Dawson, VL. (2009) Parthanatos, a messenger of death. *Front. Biosci*, 14:1116–1128.

Del, Re., Amgalan, D., Linkermann, A., Liu, Q., & Kitsis, RN. (2019). Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease. *Physiological reviews*, 99(4), 1765–1817.

Dixon, SJ., Lemberg, KM., Lamprecht, MR., Skouta, R., Zaitsev, EM. & Gleason, CE. (2012) Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149: 1060–72.

Duprez, L., Takahashi, N., Van Hauwermeiren, F., Vandendriessche, B., Goossens, V. & Vanden Berghe, T. (2011) RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity*, 35:908–18.

Eling, N., Reuter, L., Hazin, J., Hamacher-Brady, A. & Brady, NR. (2015) Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience J*, 2: 517–32.

Fink, L., Susan, L. & Cookson, BT. (2015) ‘Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells’ *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology, 3:317-53.

Flores-Peredo, L., Rodriguez, G. & Zarain-Herzberg, A. (2017) Induction of cell differentiation activates transcription of the Sarco/Endoplasmic Reticulum calcium-ATPase 3 gene (ATP2A3) in gastric and colon cancer cells. *Mol. Carcinog.*, 56(2), 735–750.

Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, TD., Özören, N. & Jagirdar, R. (2006) Cytosolic Flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. *Nature immunology*, 7(6):576-82.

Fulda, S. & Meyer, E. , Debatin, KM. (2000) Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 21, 2283-2294.

Garanina, AS., Kisurina-Evgenieva, OP., Erokhina, MV., Smirnova, EA., Factor, VM. & Onishchenko, GE. (2017) Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells. *Sci. Rep.*, 7:12555.

Golstein, P. & Kroemer, G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32:37-43.

Goto, H., Izawa, I., Li, P. & Inagaki, M. (2012) Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci*, 103:1195–200.

Green, DR. (2018). *Cell Death. Apoptosis and Other Means to an End*. New York, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Hachim, MY., Khalil, BA., Elemam, NM., Maghazachi, AA. (2020) Pyroptosis: The missing puzzle among innate and adaptive immunity crosstalk. *Journal of leukocyte biology*, 108(1):323-38.

Hampden-Thompson, G. & Galindo, C. (2017) School–family relationships, school satisfaction and the academic achievement of young people. *Educational Review*, 69 (2), 248-265. Doi: 10.1080/00131911.2016.1207613

Han, J., Zhong, CQ. & Zhang, DW. (2011) Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol.*, 12:1143–9.

He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L. & Wang, X. (2009) Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell*, 137:1100–11.

Ishikawa, F., Ushida, K., Mori, K. & Shibamura, M. (2015) Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling. *Cell death & disease*, 6(1), e1619-e1619.

Kaczmarek, A., Vandenabeele, P. & Krysko, DV. (2013) Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 38:209–23.

Kalliolias, GD. & Ivashkiv, LB. (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, 12:49–62.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, KL. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13:132 –141.

Kim, YN., Koo, KH., Sung, JY., Yun, UJ. & Kim, H. (2012) Anoikis resistance: An essential prerequisite for tumor metastasis. *Int. J. Cell Biol*, 306879.

Kim-Campbell, N., Gomez, H. & Bayir, H. (2019) Cell death pathways: Apoptosis and regulated necrosis. *Critical Care Nephrology*, Elsevier, 113-21. e112.

Kisurina-Evgenieva, OP., Khashba, LA., Mamichev, IA., Savitskaya, MA. & Onishchenko, GE. (2019) Entosis and cell cycle in tumor cell culture. *Cell Tissue Biol*, 13:8–17.

Kong, D., Zhu, J., Liu, Q., Jiang, Y., Xu, L., Luo, N., Zhao, Z., Zhai, Q., Zhang, H. & Zhu, M. (2017) Mesenchymal stem cells protect neurons against hypoxic-ischemic injury via inhibiting

parthanatos, necroptosis, and apoptosis, but not autophagy. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 37:303–313.

Kroemer, G. & Perfettini, JL. (2014) Entosis, a key player in cancer cell competition. *Cell Res*, 24:1280–1281.

Lamy, L., Ngo, VN., Emre, NC., Shaffer, AL & Yang, Y. (2013) Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 23, 435–49.

Lara, Jr., Mack, PC., Synold, T., Frankel, P., Longmate, J., Gumerlock, PH., Doroshow, JH. & Gandara, DR. (2005) The cyclin-dependent kinase inhibitor UCN-01 plus cisplatin in advanced solid tumors: a California cancer consortium phase I pharmacokinetic and molecular correlative trial. *Clin Cancer Res*, 11:4444–50; PMID:15958629.

Lee, DM., Kim, IY., Seo, MJ., Kwon, MR. & Choi, KS. (2017) Nutlin-3 enhances the bortezomib sensitivity of p53-defective cancer cells by inducing paraptosis. *Exp Mol Med*, 49:e365.

Lee, HJ., Lee, DM., Seo, MJ., Kang, HC., Kwon, SK & Choi, KS. (2022) PSMD14 targeting triggers paraptosis in breast cancer cells by inducing proteasome inhibition and Ca(2+) imbalance. *Int J Mol Sci.*, 23:2648.

Leong, SM., Tan, BX., Bte Ahmad, B., Yan, T., Chee, LY., Ang, ST., Tay, KG., Koh, LP., Yeoh, AE. & Koay, ES. (2010) Mutant nucleophosmin deregulates cell death and myeloid differentiation through excessive caspase-6 and -8 inhibition. *Blood* 116, 3286–3296.

Levine, AJ., & Oren, M. (2009) The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, 9(10), 749–758.

Lima, CMSR., Roberts, PJ., Priego, VM., Divers, SG., Thomas, MB., Boccia, RV., Stabler, K., Andrews, E., Malik, RK., Aljumaily, R., Hamm, JT., Chiu, VK., Richards, DA., Nikolinakos, P., Hussein, MA., Schuster, SR., Hoyer, RJ., Shapiro, G., Dragnev, KH. & Owonikoko, TK. (2017) Trilaciclib (G1T28): a cyclin dependent kinase 4/6 inhibitor, in combination with etoposide and carboplatin (EP) for extensive stage small cell lung cancer (ESSCLC)-phase 1b results. *Journal of Clinical Oncology*, 35(suppl), 8568.

Liu S., Luo W. & Wang Y. (2021) Emerging role of PARP1 and PARthanatos in ischemic stroke. *J. Neurochem*, 160:74–87.

Lockshin, RA. & Zakeri, Z. (2001) Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2, 545–50.

Malagobadan, S., Ho, CS. & Nagoor, NH. (2020) MicroRNA-6744-5p promotes anoikis in breast cancer and directly targets NAT1 enzyme. *Cancer Biol. Med.*, 17(1), 101–111.

Maltese, WA. & Overmeyer, JH. (2014) Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *Am. J. Pathol*, 184, 1630–1642.

Man, SM., Tourlomousis, P., Hopkins, L., Monie, TP., Fitzgerald, KA. & Bryant, CE. (2013) Salmonella infection induces

recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1 β production. *J Immunol*, 191:5239–46.

Manz, DH., Blanchette, NL., Paul, BT., Torti, FM. & Torti, SV. (2016) Iron and cancer: recent insights. *Ann N Y Acad Sci.*, 1368: 149–61.

Matsuoka, S., Ballif, BA., Smogorzewska, A., McDonald, ER., Hurov, KE., Luo, J., Bakalarski, CE., Zhao, Z., Solimini, N. & Lerenthal, Y. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316:1160–6.

Moriwaki, K. & Chan, FKM. (2016) Regulation of RIPK3- and RHIM-dependent necroptosis by the proteasome. *J Biol Chem.*, 291:5948–59.

Murphy, JM., Czabotar, PE., Hildebrand, JM., Lucet, IS., Zhang, JG. & Alvarez-Diaz, S. (2013) The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39:443–53.

Nicotera, P., Bernassola, F. & Melino, G. (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 23:2757-2765.

Overmeyer, JH., Young, AM., Bhanot, H. & Maltese, WA. (2011) A chalcone-related small molecule that induces methuosis, a novel form of non-apoptotic cell death, in glioblastoma cells. *Mol. Cancer*, 10, 69–86.

Petrillo, S., Chiabrando, D., Genova, T., Fiorito, V., Ingoglia, G. & Vinchi, F. Heme accumulation in endothelial cells impairs angiogenesis by triggering paraptosis. *Cell Death Differ*, 25:573–88.

Riedl, S.J. & Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11), 897–907.

Riffle, S., Pandey, R.N., Albert, M. & Hegde, R.S. (2017) Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*, 17:338.

Rizzolio, F., Tuccinardi, T., Caligiuri, I., Lucchetti, C. & Giordano, A. (2010) CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. *Current Drug Targets*, 11(3), 279-290.

Safta, T.B., Ziani, L. & Favre, L. (2015) Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J Immunol*, 194: 418-28.

Salimi, M., Mozdarani, H. & Majidzadeh, K. (2012) Expression pattern of ATM and cyclin D1 in ductal carcinoma, normal adjacent and normal breast tissues of Iranian breast cancer patients. *Med Oncol*, 29:1502–9.

Saraste, A. & Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.*, 45, 528-537.

Savic, V., Yin, B., Maas, N.L., Bredemeyer, A.L., Carpenter, A.C., Helmink, B.A., Yang-Iott, K.S., Sleckman, B.P. & Bassing, C.H. (2009) Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol Cell*, 34:298–310.

Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R. & Stahlberg, H. (2016) GSDMD membrane pore formation

constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. The EMBO journal, 35(16):1766-78.

Sedger, LM. & McDermott, MF. (2014) TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. Cytokine Growth Factor Rev., 25:453–72.

Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y. & Huang, H. (2015) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Nature, 526(7575):660-5.

Shimizu, A., Masuda, Y., Kitamura, H., Ishizaki, M., Ohashi, R., Sugisaki, Y. & Yamanaka, N. (2000) Complement-mediated killing of mesangial cells in experimental glomerulonephritis: cell death by a combination of apoptosis and necrosis. Nephron, 86 (2000) 152–160.

Simpson, CD., Anyiwe, K. & Schimmer, AD. (2008) Anoikis resistance and tumor metastasis. Cancer Lett., 272(2), 177–185.

Skulachev, VP. (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. Apoptosis, 11(4):473–85.

Sobhani, N., D'angelo, A., Wang, X., Young, KH., Generali, D. & Li, Y. (2020) Mutant p53 as an antigen in cancer immunotherapy. International Journal of Molecular Sciences, 21(11), 1–21.

Sollberger, G., Strittmatter, GE., Garstkiewicz, M., Sand, J. & Beer, HD. (2014) Caspase-1: the inflammasome and beyond. Innate immunity, 20(2):115-25.

Susan, LF. & Brad, TC. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73:1907-16.

Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T. & Ohsumi, Y. (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*, 12:209–218.

Taddei, ML., Giannoni, E., Fiaschi, T. & Chiarugi, P. (2012) Anoikis: An emerging hallmark in health and diseases. *J. Pathol.* 226(2), 380–393.

Tang, D., Kang, R., Berghe, TV., Vandenabeele, P. & Kroemer, G. (2019) The molecular machinery of regulated cell death. *Cell research*, 29(5), 347-364.

Tomes, L., Emberley, E., Niu, Y., Troup, S., Pastorek, J. & Strange, K. (2003) Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.*, 81:61–69.

Trabbic, CJ., Dietsch, HM., Alexander, EM., Nagy, PI., Robinson, MW., Overmeyer, JH., Maltese, WA. & Erhardt, PW. (2014) Differential Induction of Cytoplasmic Vacuolization and Methuosis by Novel 2-Indolyl-Substituted Pyridinylpropenones. *ACS Med. Chem. Lett.*, 5, 73–77.

Tripathy, D., Bardia, A. & Sellers, WR. (2017) Ribociclib (LEE011): mechanism of action and clinical impact of this selective cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor in various solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 23(13), 3251-3262.

Warny, M., Keates, AC., Keates, S., Castagliuolo, I., Zacks, JK., Aboudola, S., Qamar, A., Pothoulakis, C., LaMont, JT. & Kelly,

CP. (2000) p38MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J. Clin. Invest.*, 105, 1147–1156.

Wong, RSY. (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *JECCR*, 30:87.

Wu, GS., Burns, TF., McDonald III, ER., Jiang, W., Meng, R., Krantz, ID., Kao, G., Gan, DD., Zhou, JY., Muschel, R., Hamilton, SR., Spinner, NB. & Matkowitz, S. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-induced p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet.*, 17, 141-143.

Wynford-Thomas, D. (1997) Proliferative lifespan checkpoints: Cell-type specificity and influence on tumour biology. *European Journal of Cancer Part A*, 33(5), 716–726.

Xia, X., Wang, X., Cheng, Z., Qin, W., Lei, L. & Jiang, J. (2019) The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-“host”? *Cell death & disease*, 10(9):1-13.

Xuan, Y. & Hu, X. (2009) Naturally-occurring shikonin analogues – a class of necroptotic inducers that circumvent cancer drug resistance. *Cancer Lett.*, 274(2):233–42.

Yokoi, K., Yamaguchi, K., Umezawa, M., Tsuchiya, K. & Aoki, S. (2022) Induction of Paraptosis by Cyclometalated Iridium Complex-Peptide Hybrids and CGP37157 via a Mitochondrial Ca(2+) Overload Triggered by Membrane Fusion between Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum. *Biochemistry*, 61:639–55.

Zhu, D., Chen, C., Xia, Y., Kong, L.Y. & Luo, J.A. (2019) Purified Resin Glycoside Fraction from *Pharbitidis* Semen Induces Paraptosis by Activating Chloride Intracellular Channel-1 in Human Colon Cancer Cells. *Integr Cancer Ther*, 18:1534735418822120.

Zilfou, J.T. & Lowe, S.W. (2009) Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), 1–13.

BÖLÜM IV

Üzümlerde Okratoksijenik *Aspergillus* Varlığı

Gülçin ÖZCAN ATEŞ¹
Nükhet Nilüfer ZORBA²
Burhan ŞEN³

1. Giriş

Üzüm (Vitaceae ailesine ait *Vitis* spp.) şeker, lif ve vitamin içeren besleyici mevsimsel bir meyve olup, kısa depolama ömrüne sahiptir (Gray, Jyasankar & Li, 2005; Tian & ark., 2015). Üzüm özellikle 20° ile 51° enlemleri arasındaki bölgelerde yetişmektedir. Bununla birlikte bazı varyeteleri tropikal ve nemli iklimlerde yetişebilmektedir. Dolayısıyla farklı bölgelerde farklı üzüm çeşidi ve varyeteleri bulunabilmektedir, hatta bazı bölgelerde yetişen çeşit ve varyeteleri o bölgeye özgüdür. Dünyada en çok üretilen üzüm çeşidi

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Çanakkale/Türkiye, Orcid: 0000-0002-8467-2378, gulcinozcan87@gmail.com

² Prof. Dr., Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çanakkale/Türkiye, Orcid: 0000-0001-6851-6474, nukhetzorba@gmail.com

³ Prof. Dr., Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Edirne/Türkiye, Orcid: 0000-0002-8477-9570, burhansen88@trakya.edu.tr

ise *Vitis vinifera* L. olup, antik üzüm olarak bilinmektedir. Üzüm, taze meyve olarak tüketildiği gibi pekmez, kuru üzüm, sirke, reçel, şıra, meyve suyu ve şarap gibi birçok gıdanın üretiminde kullanılmaktadır. Bu nedenle de ekonomik değeri yüksek bir tarımsal üründür (Gray, Jyasankar & Li, 2005). Türkiye’de üzüm üretiminin önemli bir gelir kaynağı olması nedeniyle hasat öncesi, sırası ve sonrasında üzümlerde meydana gelecek kontaminasyona bağlı kayıplar çok önemlidir (Kabak & Var, 2006). Ancak mikroorganizmaların üzümlerin yüzeyine nasıl kolonize olduğu ya da üzümleri nasıl kontamine ettiğine dair net bir bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte üzümlerde mikroorganizma bulunması ve üremesi bazı faktörlere bağlıdır (Fleet, 1999). Bu faktörler arasında üzümün yetiştiği bölge ve iklim koşulları (sıcaklık, yağış, nem vb.), üzüm çeşidi ve rengi, üzüm salkımının yeri, salkımdaki üzümün yeri, üzüm yüzeyinde kutikular tabakanın yani mumsu tabakanın olup olmadığı, üzümün olgunlaşma düzeyi ve olgunlaşmasına bağlı şeker içeriği, üzümde fiziksel hasar olup olmadığı, üzümün yetiştiği toprak ve üzüm yetiştiriciliğinde kullanılan bağcılık uygulamaları (fungisit ya da insektisit gibi zirai ilaçların kullanıp kullanılmadığı) vb. etkenler sıralanabilir.

Bozulabilir bir meyve olan üzümde kontaminasyon hasat öncesi, sırası ve sonrası aşamalarda meydana gelebilmekle birlikte, özellikle hasat sonrasında meydana gelen fungal kontaminasyona bağlı bozulmalar depolama süresini azaltan ve meyve kalitesini etkileyen en büyük sorunlardan biridir. Üzümlerde depolama sürecinde hızlı ve büyük miktarda bozulmalara neden olan ve siyah küf hastalığı etkeni olarak bilinen *Aspergillus niger* Tiegh. mikrofungusuna karşı oldukça duyarlıdır. Üzümlerde hasat sonrası

primer patojenleri arasında *Aspergillus niger* türüne ek olarak *Botrytis cinerea* Pers. ve *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. türleri de yer almakta olup, *Penicillium* ve *Mucor* cinsine ait bazı üyelerde üzümün bozulmalarından sorumlu kontaminantlardır (Valero & ark., 2008; Aydoğdu & Güçer, 2009; Wang & ark., 2015; Tian & ark., 2015).

Mikrofunguslar tarafından üzümlerde oluşturulan hastalıklar hem ürüne hasar vermekte hem de gelişen mikrofungusun ürettiği bazı sekonder metabolitler insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Özellikle mikrofunguslar tarafından üretilen sekonder metabolitlerin bazıları üzümlerin ürünlere işlenmesi sırasında uygulanan ısı işlemlere dayanıklıdır, dolayısıyla ürünlerde prosesler sonucunda degrade olmadan kalmaktadır. Bu nedenle üzümlerde bulunan ve sekonder metabolit üreten *Aspergillus* cinsi oldukça önem taşımaktadır. *Aspergillus* cinsi insan sağlığına oldukça zararlı bir mikotoksin olan okratoksin A (OTA) üretmektedir ve OTA ısı ile parçalanmamaktadır.

Bir gıdada mikotoksinin varlığı, üretim veya işlemenin bir aşamasında, bir toksijenik mikrofungusun olduğunu ve mikotoksin üretimi için koşulların elverişli olduğunu göstermektedir (Taniwaki, Pitt & Magan, 2018). Bu nedenle bu çalışmada üzümlerde kontaminasyonu önemli olan *Aspergillus* cinsinin özellikleri ve üzümlerde tespit edilen OTA üreticisi *Aspergillus* türleri ile ilgili yapılan çalışmalardan bahsedilmiştir.

2. *Aspergillus* Cinsinin Özellikleri

Aspergillus P. Micheli ex Haller mikrofungusu ilk kez 1729 yılında Micheli tarafından bir organizma olarak tanınmış, ekonomik

ve sosyal etkileri yüksek olan bir cinstir. Ayrıca, *Aspergillus* gıda, iç ortam havası ve insan sağlığı etkileyen ve biyoteknoloji alanında kullanılan oldukça önemli türleri içermektedir (Krijgsheld & ark., 2013; Samson & ark., 2014). *Aspergillus* cinsi üyeleri biyoteknoloji alanında enzim, organik asit ve çeşitli farmasötikler (antibiyotik, ilaçlar) gibi çeşitli primer ve sekonder metabolitler üretmektedir ve birçok gıdanın üretiminde fermentasyon ajanı olarak kullanılmaktadır (Samson & ark., 2014; Taniwaki, Pitt & Magan, 2018).

Aspergillus dünyada çok farklı habitatlarda ve en bol bulunan cinslerden biridir. Özellikle tropikal toprak ve bitki örtüsü habitatlarında bol miktarda bulunmaktadır. Abiyotik büyüme koşullarına göre çok seçici değildirler. 6-55°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında ve nispeten düşük nemde, düşük asitlik ve/veya düşük oksijen seviyelerinde gelişebilmektedirler. *Aspergillus penicilloides* Speg. türü en kserofilik mikrofunguslar arasında yer almaktadır. Ek olarak *Aspergillus* cinsi çok farklı substratlar üzerinde (hayvan dışkıları ve insan dokusu vb.) gelişebilmekte olmasına rağmen çoğunlukla karmaşık bitki polimerlerinde daha fazla bulunmaktadır. Bu nedenle de gıdalarda bozulma etmeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Gıda maddelerin bozulmasına ek olarak insan sağlığı açısından önemli olan mikotoksinleri üretmektedir. Yalnızca birkaç *Aspergillus* türü gıdalarda önemli mikotoksin üreticileridir. (Bennett, 2010; Krijgsheld & ark., 2013; Houbraken, Vries & Samson, 2014; Samson & ark., 2014; Taniwaki, Pitt & Magan, 2018).

Gıda maddelerinin bozulmasında ve mikotoksinlerin üretiminde en önemli üç mikrofungus cinsinden biri olan *Aspergillus*

türleri genellikle kseroofilik olmakla birlikte mikotoksin üreticisi olan türler 0,80 ve yakın değerlerdeki su aktivitesine sahip ürünlerde bulunmaktadır. Bazı türleri saprofitik olup hasattan sonra üreme gösterirken, bazıları ise kommensal olup bazı bitkisel ürünlerde üreyebilmekte ve hasat öncesinde üründe zarara sebep olmaksızın çekirdek veya tane üzerinde gelişebilmektedir. *Aspergillus niger* türü ise bazı meyve ve sebzelerde patojen olup, en yaygın türdür. Bununla birlikte, *Aspergillus niger* suşları nadiren mikotoksin üretmektedir. (Taniwaki, Pitt & Magan, 2018).

Aspergillus cinsinin çok farklı habitatlarda bol miktarda bulunmasının nedeni ise başarılı bir şekilde dağılmasıyla ilişkilidir. Bu cinsin sporları havada, en baskın mikrofunguslar arasındadır ve sporları hem kısa hem de uzun mesafelere yayılabilmektedir. (Bennett, 2010; Krijgsheld & ark., 2013; Samson & ark., 2014; Taniwaki, Pitt & Magan, 2018). *Aspergillus* cinsinin havada kolayca taşınabilen yoğun kuru sporları nedeniyle de kapalı ortamlarda karşılaşılan tipik iç mekân mikrofungusudur. Bu nedenle de insanlar iç ortam havasında yoğun konsantrasyonlarda *Aspergillus* sporlarına maruz kalmaktadır (Houbraken, Vries & Samson, 2014; Özcan Ateş, 2021).

Aspergillus cinsi üyelerinin sadece saprofit yaşam tarzları bulunmamaktadır *Aspergillus* cinsi üyeleri bitki hastalıklarının başlıca nedeni olmasa da bazı bitki ve bitkisel ürünlerde bazı bozulmalardan sorumludur. Bitki ve bitkisel ürünlerde bozulmalarda *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* Link en fazla görülen türler olup, onları *Aspergillus parasiticus* Speare, *Aspergillus ochraceus* G. Wilh., *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom ve *Aspergillus alliaceus* Thom & Church türleri takip etmektedir (Perrone & ark.

2007). Örneğin Pawar & ark., (2008) *Aspergillus niger* türünün *Zingiber officinale* Rosc. (zencefil) bitkisinin patojeni olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte *Aspergillus* cinsi üyeleri bağışıklık sistemi zayıf olan bireyleri enfekte etmektedir. Sağlıklı bireyleri enfekte ettiği ise tespit edilmemiştir. Bağışıklığı zayıf olan bireylerde çoğunlukla *Aspergillus fumigatus* Fresen. ve daha az oranlarda ise *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* Thom ve *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter gibi türlerinin invaziv aspergilloza (birkaç organ sistemini, özellikle akciğer hastalığını içerir), invaziv olmayan pulmoner aspergilloma ve alerjik bronkopulmoner aspergilloza neden olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla *Aspergillus* cinsi üyeleri sadece bitki ve gıda bozulma etmeni ve patojeni değil aynı zamanda sıklıkla insanlar ve hayvanlar için fırsatçı patojen olarak da rapor edilmektedir (Bennett, 2010; Krijgsheld & ark., 2013; Samson & ark., 2014; Taniwaki, Pitt & Magan, 2018).

3. *Aspergillus* Cinsinin Taksonomisi

Aspergillus cinsi hızlı gelişen ve beyaz, sarı, sarı-kahverengi, pembe, kahverengi, kahverengimsi-siyah, siyah veya yeşilin tonları şeklinde koloniler oluşturur. Keçe gibi ve dik konidiasporları şişmiş apeks (vezikül) ile dalsız sap (çoğunlukla septasız) şeklindedir (Pitt & Hocking, 2009; Samson & ark., 2010).

Aspergillus cinsi, mikroskobik karakteristik konidiasporları ile kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Fenotipik sınıflandırılmasında mikromorfolojik (vesikül şekil ve büyüklüğü, konidia ve sap morfolojisi, Hülle hücrelerinin varlığı, vb.) ve makromorfolojik (sclerotia ve cleistothecia üretimi, çözünebilir pigment ve eksüdaların üretimi, kolonin alttan rengi, koloni çapı, misel rengi ve

konidia içerip içermediği gibi) özellikleri kullanılabilmektedir (Rodrigues & ark., 2007). Hatta bu özellikler ile agar ortamındaki büyüme oranları mikologlar tarafından standart laboratuvar koşulları altında belirlenmiş ve *Aspergillus* cinsine ait türlerin tanımlanmasında kullanılması üzerine anahtarlar ve çeşitli kılavuzlar oluşturulmuştur. (Samson & ark., 2007; Pitt & Hocking, 2009; Samson & ark., 2010). Ancak *Aspergillus* cinsinin sınıflandırması oldukça karmaşıktır ve sürekli değişmektedir. Fenotipik bazlı sınıflandırma yerini günümüzde DNA dizi verilerine dayalı moleküler sınıflandırmaya bırakmıştır (Houbraken & Samson, 2011; Houbraken & ark., 2016). Bununla birlikte DNA dizi analizine dayalı moleküler tanımlama ile fenotipik olarak tanımlamaya dayanan mevcut sistemle hala büyük bir örtüşmeye sahiptir (Raper & Fennell, 1965; Houbraken & Samson, 2011; Houbraken & ark., 2020).

Son zamanlarda yapılan çok sayıda çalışma ile özellikle tıbbi açıdan önemli olan *Aspergillus* türlerin tanımlanması için tek başına kullanılan morfolojik yöntemlerin yeterli olmadığı bildirilmiştir. Geleneksel fenotipe dayalı yöntemlerle birlikte kullanılan karşılaştırmalı DNA dizisine dayalı yöntemlerin, bu cins içindeki türlerin daha iyi çözülmesini sağlayabildiği giderek daha fazla kabul edilmektedir. Moleküler tanımlamada, bölümler arası seviye tanımlaması için ITS bölgelerinin ve çeşitli *Aspergillus* bölümleri içindeki bireysel türlerin tanımlanması için β -tubulin ve Calmodulin gen bölgelerinin kullanılmasını gerektiğini belirtilmiştir (Balajee & ark., 2007; Samson & ark., 2014) Ancak son yıllarda özellikle tanımlamada moleküler sınıflandırmanın yanında kemotaksonomik

sınıflandırmada kullanılmaktadır (Krijgsheld & ark., 2013; Samson & ark., 2014).

Aspergillus cinsi Eurotiales takımı, Eurotiomycetes sınıfı, Ascomycota şubesi, Aspergillaceae ailesine aittir (Houbraken, Vries & Samson, 2014).

Eurotiales takımı, yeni tanıtılmış *Penicillaginaceae* ailesi birlikte *Aspergillaceae*, *Elaphomycetaceae*, *Thermoascaceae* ve *Trichocomaceae* ailerini içermektedir. Eurotiales takımı 15 cins *Aspergillaceae* ailesinde, 8 cins *Trichocomaceae* ailesinde, 2 cins *Thermoascaceae* ailesinde ve bir cins *Penicillaginaceae* ailesi olmak üzere 28 cins içermektedir. *Aspergillaceae* ailesi içerisinde *Aspergillago*, *Aspergillus*, *Evansstolkia*, *Hamigera*, *Leiothecium*, *Monascus*, *Penicilliopsis*, *Penicillium*, *Phialomyces*, *Pseudohamigera*, *Pseudopenicillium*, *Sclerocleista*, *Warcupiella*, *Xerochrysium* ve *Xeromyces* cinsleri yer almaktadır. *Trichocomaceae* ailesi içerisinde ise *Acidotalaromyces*, *Ascospirella*, *Dendrosphaera*, *Rasamsonia*, *Sagenomella*, *Talaromyces*, *Thermomyces* ve *Trichocoma* cinsleri yer almaktadır. *Thermoascaceae* ailesi de *Paecilomyces* ve *Thermoascus* cinslerini içermektedir (Houbraken & ark., 2020).

Aspergillus cinsi morfolojik, fizyolojik ve filogenetik yapılarına dayanarak oluşturulan birçok farklı türü içeren anamorf bir cinstir. *Aspergillus* cinsinin alt türlerini temsil eden *Aspergillus*, *Circumdati*, *Cremeri*, *Fumigati*, *Nidulantes* ve *Polypaecilum* olmak üzere altı ana soy (subgenus) vardır. Alt gende iki sınıf (bölüm) mevcuttur *Aspergillus* şu anda 5'i yeni olmak üzere 27 bölüm içermektedir (Houbraken & ark., 2020).

Aspergillus subgenusu *Restricti* ve *Aspergillus* sectionlarını içermektedir. *Circumdati* subgenusu *Candidi*, *Petersoniorum*, *Nigri*, *Terrei*, *Flavipedes*, *Janorum*, *Circumdati*, *Tannerorum*, *Robusti* ve *Flavi* sectionlarını içermektedir. *Nidulantes* subgenusu *Nidulantes*, *Usti*, *Aenei*, *Cavernicolarum*, *Raperorum* sect. nov., *Silvatici* sect. nov., *Bispori* sect. nov., *Ochraceorosei* ve *Sparsi* sectionlarını içermektedir. *Fumigati* subgenusu *Fumigati*, *Clavati*, *Vargarum* sect. nov. ve *Cervini* sectionlarını içermektedir. Son olarak *Cremeri* ve *Polipaecilum* sectionları vardır (Houbraken & ark., 2020).

4. Okratoksin Üretici *Aspergillus* Türleri

Okratoksinler ilk defa 1965 yılında *Aspergillus ochraceus* türünün sekonder metaboliti olarak izole edilmiş ve kimyasal olarak karakterize edilmiş bir mikotoksindir (Malir & ark., 2016). Okratoksinin üç farklı bileşeni bulunmaktadır: Okratoksin A (OTA), Okratoksin B (OTB) ve Okratoksin C (OTC). Üç bileşiğin tümü, dihydroisocoumarin kısmına bir peptit bağı aracılığı ile bir 7-karboksi grubunun L-fenilalanin bağlanmış şeklidir. OTB (klor atomu eksik) ve OTC (OTA'nın etil esteri) türlerine göre OTA en bilinen türü olup, daha yaygındır ve toksiktir (Zöllner & Mayer-Helm, 2006; Valero & ark., 2007; Malir & ark., 2016).

OTA, kanserojenik, teratojenik, nefrotoksijenik, nörotoksijenik, genotoksik, embriyotoksik, hepatotoksik ve immünotoksik gibi insan ve hayvan sağlığı için olumsuz özellikler sergileyen bir moleküldür. (Perrone & ark., 2007; Malir & ark., 2016). Ulusal Kanser Enstitüsü/Ulusal Toksikoloji Programı (NCI/NTP) tarafından kemirgenlerde incelenen en güçlü böbrek kanserojenlerinden biri olarak tanımlamıştır (Malir & ark., 2016). Ayrıca OTA'nın şiddetli böbrek hasarı ile karakterize olan endemik

Balkan nefropati etiyolojisiinde rol olabileceğini belirlenmiştir. Bu nedenle Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (International Agency for Research on Cancer-IARC) OTA'yı olası kanserojenik (grup 2B) olarak sınıflandırmıştır (Leong, Hocking & Scott, 2007; Perrone & ark., 2007; Valero & ark., 2007; Wang & ark., 2015; Tian & ark., 2015; Malir & ark., 2016).

Aspergillus türleri tarım ürünlerini hasat öncesi, hasat, hasat sonrası ve depolama gibi farklı aşamalarda kontamine edebilmektedirler. Tarım ürünlerinde *Aspergillus* türlerinin neden olduğu bozulmalarda pigmentasyon, renk bozulması, çürüme, kötü koku ve kötü tat gelişimi gibi değişkenlikler görülebilmektedir. Özellikle *Aspergillus* türlerinin gıdalara ve hayvan yemlerine olan kontaminasyonu oldukça önemlidir. Fırsatçı patojen olan *Aspergillus* türlerine çoğunlukla bitkisel ürünlerde depo küfleri olarak rastlanmaktadır. (Perrone & ark., 2007). Bununla birlikte *Aspergillus* cinsi üyeleri önemli OTA üreticileridir (Perrone & ark., 2007; Taniwaki, Pitt & Magan, 2018). OTA, dünyanın her yerinde çeşitli gıda ve yem ürünlerini (tahıllar, baklagiller, kahve, kuru meyveler, bira ve şarap ve et) kontamine edebilen güçlü bir nefrotoksindir (Perrone& ark., 2007).

Aspergillus cinsi üyeleri arasından; *Aspergillus albertensis* J.P. Tewari, *Aspergillus alutaceus* Berk. & M.A. Curtis, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus* (Guég.) Saito, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus foetidus* Thom & Raper, *Aspergillus fresenii* Subram., *Aspergillus lacticoffeatus* Frisvad & Samson, *Aspergillus melleus* Yukawa, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus ostianus* Wehmer, *Aspergillus sclerotiumniger* Samson & Frisvad, *Aspergillus steynii* Frisvad & Samson,

Aspergillus tubingensis Mosseray, *Aspergillus wentii* Wehmer ve *Aspergillus westerdijkiae* Frisvad & Samson türlerinin OTA üreticisi olduğu farklı çalışmalarda bildirilmiştir (Cabañes & ark., 2002; Bellí & ark., 2004; Varga & Kozakiewicz, 2006; Zöllner & Mayer-Helm, 2006; Leong, Hocking & Scott, 2007; Samson & ark., 2010; Malir & ark., 2016).

Başlıca okratoksijenik üreticisi *Aspergillus* türü ise üç tanedir. Bu üç tür; *Aspergillus flavus* ve yakın akrabaları, *Aspergillus ochraceus* ve yakın akrabaları ile *Aspergillus carbonarius* ve yakından ilişkili *Aspergillus niger* türleridir. OTA üreten tüm *Aspergillus ochraceus* ve yakın akrabaları, *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus niger* türlerinin ekin bitkilerine bilinen bir afinitesi bulunmadığı için kontaminasyon ve mikotoksin üretimi genellikle hasattan sonra gerçekleşmektedir. Fakat üzüm de bir istisna söz konusudur. Olgunlaşan üzümler yüksek asitlik ve şeker içeriklerine sahiptir, bu nedenle de üzümler birçok *Aspergillus* türü için ideal substrattır. Üzümlerin olgunlaşması sırasındaki yüksek sıcaklıklar ve güneş ışığı, siyah *Aspergillus* türlerini bağların ortak sakinleri olmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte *Aspergillus* türlerinin sağlam üzüm kabukları içine nüfus edemedikleri de belirlenmiştir. Üzümlerin yetiştirme yöntemleri ya da hasat ekipmanlarından kaynaklanan mekanik hasarlardan ve bazı bitkilerde hasat dönemine yakın görülen yağmur olaylarından dolayı üzümün kabuğunda meydana gelen kırılmalardan dolayı olgunlaşan üzümlere giriş *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* veya külleme mikrofungusları gibi patojenik fungusların saldırısından kaynaklanmaktadır. Uygun giriş ortamı kazanıldığında siyah *Aspergillus* türleri asidik ve yüksek şeker ortamında gelişebilmektedir. *Aspergillus carbonarius* ve

Aspergillus niger türleri genellikle hasat aşamasındaki üzümlerde gelişmekte ve güneşte kurutulması sırasında ise OTA oluşumu gerçekleşmektedir. Üzümlerin su aktivitesi 0,80'nin altına düşünceye kadar *Aspergillus* türleri üremeye ve OTA üretmeye devam etmektedirler. *Aspergillus carbonarius*, üzümlerde ve üzüm ürünlerinde OTA oluşumu için önemli bir tür olup, *Aspergillus niger* ise oldukça düşük oranda OTA üreticisidir. *Aspergillus japonicus* Saito ve diğer uniseriate siyah *Aspergillus* türlerinin okratoksin üreticisi oldukları ise belirlenememiştir. Şarap yapımında kullanılan üzümlerde, fermantasyon sırasında elde edilen anaerobik koşullar dolayısıyla küflerin üremesi ve toksin üretimleri durmaktadır. Bu nedenle, şaraplardaki OTA oluşumunun kontrolü iyi bağ yönetimine, yani salkım köklerinin ve kabuk bölünmesinin kontrolüne ve hasat ile kırma arasında kısa bir zaman aralığına dayanmaktadır (Taniwaki, Pitt & Magan, 2018).

5. Üzümlerde Okratoksin Üreticisi *Aspergillus* Türleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Üzümlerde *Aspergillus* ve OTA üretimleri ile ilgili literatürde farklı bölgelerde yapılmış çalışmalar bulunmakta olup, kronolojik olarak çalışmalar sıralanmıştır.

Sage & ark., (2002) Güney Fransa'da şarap yapımında kullanılan 11 üzüm örneğinden izole ettikleri 14 *Aspergillus carbonarius* izolatının in vitro ortamda besiyerinde 0.1 ± 0.0 ile 87.5 ± 1.1 µg/g OTA ürettiğini belirlemişlerdir.

Battilani & ark., (2003) 1999 ve 2000 yıllarında İtalya'nın kuzeyinden altı üzüm örneği (5 kırmızı ve 1 beyaz) ve güneyinden üç üzüm örneğini (1 kırmızı ve 2 beyaz) olgunlaşma öncesi ve

sonrası olmak üzere iki farklı dönemde toplamışlar ve örnekleri *Aspergillus* kontaminasyonu için değerlendirmişler. Sonuç olarak üzüm örneklerinden 477 izolat elde etmişler. Elde ettikleri *Aspergillus ochraceus* izolatlarının tamamının, *Aspergillus carbonarius* izolatlarının %60'nın, *Aspergillus fumigatus* izolatlarının %50'sinin, uniseriate ve biseriate *Aspergillus niger* izolatlarının ise sırasıyla %3'ünün ve %5'inin OTA üreticisi olduğunu belirlemişlerdir. Uniseriate izolatların <1 µg/kg düzeyinde, biseriate izolatların ise <10 µg/kg düzeyinde, *Aspergillus carbonarius* türlerinin ise 100 µg/kg düzeyinde OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Magnoli & ark., (2003) Arjantin'in Mendoza eyaletindeki bir şarap imalathanesinden 2001 yılında elde ettikleri 50 adet şaraplık üzüm örneğinin %70'inin *Aspergillus* ile kontamine olduğunu, elde ettikleri *Aspergillus* izolatlarının ise %61'inin *Aspergillus niger* var. *niger*, %17'sinin *Aspergillus flavus* ve geri kalanlarının ise *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus foetidus* ve *Aspergillus candidus* olduğunu belirlemişlerdir. Elde ettikleri 63 siyah *Aspergillus* izolatının %41.3'ünün ise 2 ile 24.5 ng/ml OTA üreticisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Serra & ark., (2003) 2001 yılının Temmuz ve Eylül ayları arasında Portekiz'de şaraplık üzüm üretimi yapan dört bölgedeki 11 bağdan üzüm örneklerini olgunlaşmanın 3 farklı döneminde toplamışlar. Sonuç olarak üzüm örneklerinden elde ettikleri izolatların 370 tanesinin (%22) *Aspergillus* cinsi olduğu tespit etmişlerdir. Siyah *Aspergillus* (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus japonicus* ve *Aspergillus niger* aggregate) oranın %90 olduğunu ve bu izolatlardan *Aspergillus carbonarius* izolatlarının %97'sinin ve

Aspergillus niger aggregate izolatlarının ise %4'ünün OTA üreticisi olduğunu belirlemişlerdir.

Sage, Garon & Seigle-Murandi (2004) sekiz Fransız şaraplık üzüm bağının okratoksin A riskini değerlendirmek için beş şarap üretim bölgesinden topladıkları 60 üzüm örneğinden 75 *Aspergillus* izolatı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Elde ettikleri izolatların 29 tanesini *Aspergillus niger*, 14 tanesini *Aspergillus fumigatus*, 10 tanesini *Aspergillus carbonarius*, 6 tanesini *Aspergillus parasiticus*, 5 tanesini *Aspergillus aculeatus*, 3 tanesini *Aspergillus terreus*, 3 tanesini *Aspergillus ustus*, 3 tanesini *Aspergillus versicolor*, 1 tanesini *Aspergillus candidus* ve 1 tanesini ise *Aspergillus flavipes* olarak tanımlamışlardır. *Aspergillus carbonarius* izolatlarının ise Czapek Yeast Extract Agar besiyerinde (CYA) 0.01-1.90 µg/g OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Bau & ark., (2005) İspanya'nın Akdeniz kıyısı boyunca yer alan beş üzüm yetiştirme bölgesine ait olan toplam yedi bağdan 2001 yılında üzümlerin olgunlaşmasının 4 farklı döneminde topladıkları üzüm örneklerinden 2800 mikrofungus izolatı elde etmişler ve bu izolatların %17.3'ünün (628) *Aspergillus* cinsi üyeleri olduğunu tespit etmişlerdir. 14 farklı *Aspergillus* türünden *Aspergillus melleus* izolatlarından 1 tanesinin 7.28 µg/g ve *Aspergillus ochraceus* izolatlarından 1 tanesini ise 73.81 µg/g düzeyinde OTA ürettiğini belirlemişlerdir. Elde ettikleri 101 *Aspergillus carbonarius* izolatının ise tamamının 1.92 ile 195.46 µg/g arasında değişen konsantrasyonlarda OTA ürettiğini bildirmişlerdir.

Bellí & ark., (2005) İspanya'daki dört şarapçılık bölgesindeki 40 bağdan üzümlerin olgunlaşma döneminde farklı

zamanlarda örnek toplamışlar. 2002 yılında toplam 467, 2003 yılında ise toplam 648 *Aspergillus Nigri* izolatu aldıklarını bildirmişlerdir. Elde ettikleri izolatların in vitro besiyerinde OTA üretimlerini değerlendirdiklerinde 2002 yılı izolatlarının %82'sinin ve 2003 yılı izolatlarının %76'sının OTA üreticisi olduğunu belirlemişlerdir.

Serra, Braga & Venâncio (2005). Portekiz'deki dört bağcılık bölgesinde bulunan üzüm örneklerini 2001 ile 2003 yılları arasında üzümlerin olgunlaşma aşamasında (3 farklı olgunlukta) 11 bağdan toplamışlar ve mikrofungus kontaminasyonu açısından değerlendirmişlerdir. Toplamda 10602 mikrofungus izolatu elde etmişler ve bu izolatların %8'ini (802) *Aspergillus* cinsi üyelerinin oluşturduğunu belirlemişlerdir. Elde ettikleri *Aspergillus alliaceus* (1) ve *Aspergillus carbonarius* (68) izolatlarının tamamının, *Aspergillus niger aggregate* (571) izolatlarının ise %4'ünün OTA üreticisi olduğunu bildirmişlerdir.

Bejaoui & ark., (2006) farklı coğrafi konumlara ve iklim koşullarına sahip Fransa'daki dört şarap üretim bölgesindeki 10 üzüm bağından 2001, 2002 ve 2003 yıllarında örnekleme yaparak üzümleri siyah *Aspergillus* kontaminasyonu ve OTA üretimleri açısından değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak 2001 yılında 721, 2002 yılında 711 ve 2003 yılında 1035 izolat elde etmişler ve bu izolatların %80'inin *Aspergillus* cinsi üyeleri olduğunu ve bu izolatlarının %99'unun ise siyah *Aspergillus* türleri olduğunu bildirmişlerdir. %1'lik kısmı ise *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus fumigatus* izolatlarının oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen toplam 1974 siyah *Aspergillus* izolatından %37'sinin (745) CYA besiyerinde OTA üreticisi olduğunu belirlemişlerdir.

Bellí & ark., (2006) İspanya'da köklü bir şarapçılık geleneğine sahip La Rioja bölgesinde 10, Katalonya'da 24 ve Valensiya'da 11 olmak üzere üç farklı bölgedeki üzüm bağlarından 2001, 2002 ve 2003 yılında örnek toplamışlardır. Bu bağlarda *Aspergillus ochraceus* bulunma oranının 3 yıl boyunca ortalama %0.16 olduğunu tespit etmişler. İzole edilen diğer *Aspergillus* izolatlarının %95'inin *Nigri* section'a ait olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen 671 *Aspergillus niger aggregate* izolatının %4.5'inin 0.04 ile 1.94 µg/g, 175 *Aspergillus carbonarius* izolatının %87'sinin 0.05 ile 477.3 µg/g düzeylerinde ve 65 *Aspergillus ochraceus* izolatının %35'inin OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Guzev & ark., (2006) İsrail'deki 10 üzüm (Sauvignon Blanc ve Cabernet Sauvignon ile sofralık Superior üzüm çeşitleri olan) bağında 2001, 2002 ve 2003 yıllarında *Aspergillus Nigri* izolatlarının sayısını ve in vitro OTA üretim kapasitesini değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda 2114 izolat elde etmişler ve bu izolatlardan 161 tanesinin (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger aggregate* ve uniseriate izolatlarının) OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Serra, Mendoza & Venâncio (2006) üç yıl (2001, 2002 ve 2003) süre ile hasat döneminde şarap üretimi için ayrılan toplam 93 Portekiz üzüm örneğini *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus niger aggregate* kontaminasyonu açısından değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak üzüm örneklerinden 571 tane *Aspergillus niger aggregate*, 68 tane *Aspergillus carbonarius*, 8 tane *Aspergillus ibericus*, 2 tane *Aspergillus japonicus* ve 1 tane *Aspergillus aculeatus* olmak üzere toplam 650 izolat elde ettiklerini belirtmişlerdir. *Aspergillus carbonarius* izolatlarının tamamının,

Aspergillus niger aggregate izolatlarının ise %4'ünün OTA üreticisi olduğunu bildirmişlerdir.

Tjamos, Antoniou & Tjamos (2006) Yunanistan'ın beş şarap üretim bölgesinde bulunan 16 bağdan (11 üzüm çeşidi) 2002 ve 2003 yıllarında olgunlaşmanın 3 farklı döneminde topladıkları üzüm örneklerinin *Aspergillus niger* aggregate ve *Aspergillus carbonarius* ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir. *Aspergillus carbonarius* izolatlarının %79'unun, *Aspergillus niger* aggregate izolatlarının ise %73'ünün OTA üreticisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Lasram & ark., (2007) 2004 sezonunda, Tunus'un kuzeydoğusundaki ticari üretimin %60'ını yapan bir bağdan 3 farklı olgunlaşma döneminde üzüm örnekleri toplamışlar ve 47 *Aspergillus carbonarius*, 84 *Aspergillus niger* aggregate ve 1 uunseriate izolattan oluşan toplam 132 siyah *Aspergillus* izolatu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Elde ettikleri *Aspergillus carbonarius* izolatlarının %94'ünün, *Aspergillus niger* aggregate izolatlarının ise %3'ünün OTA üreticisi olduğunu belirlemişlerdir.

Ponsone & ark., (2007) Arjantin'in Mendoza eyaletinde bulunan dört üzüm bağından 2003-2004 yılları arasında üzüm örnekleri toplamışlar ve örneklerin *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus* ve *Aspergillus niger* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatların sadece %24'ünün OTA üreticisi olduğunu, *Aspergillus japonicus* ve *Aspergillus aculeatus* izolatlarının 1.3 ile 6.3 ng/mL, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* ve *Aspergillus foetidus* izolatlarının ise 1.3 ile 50 ng/mL

arasında değişen konsantrasyonlarda OTA ürettiğini belirlemişlerdir.

Melki Ben Fredj & ark., (2008) Tunus'un 4 farklı bölgesinde bulunan bağlardan topladıkları üzüm örneklerinin %33.32'sinin *Aspergillus* cinsi üyeleri ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir. *Aspergillus* cinsine ait izolatları ise *Aspergillus niger* agregatı (%77), *Aspergillus carbonarius* (%15) ve *Aspergillus flavus* (%8) olarak tanımlamışlardır.

El-Khoury & ark., (2008) 2005 yılı boyunca olgunlaşmanın iki farklı döneminde Lübnan üzümlerinden 510 adet mikrofungus izolasyonu gerçekleştirmişler ve elde ettikleri izolatların 487 tanesinin *Aspergillus* (%95.5) cinsine ait olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri 487 *Aspergillus* izolatının %52.2'sini *Aspergillus niger* aggregate, %43.1'ini *Aspergillus flavus* %2,9'sini *Aspergillus japonicus* ve %1.8'ini *Aspergillus carbonarius* olarak tanımlamışlardır. *Aspergillus carbonarius* izolatlarının CYA besiyerinde tamamının OTA ürettiğini ve konsantrasyonlarının 8,38 µg/g ulaştığını bildirmişlerdir.

Atar Selouane & ark., (2009) 2004-2006 yılları arasında Fas'ta bulunan 4 bağdan topladıkları üzüm örneklerinden *Aspergillus* cinsine ait 360 izolat elde ettikleri ve elde ettikleri izolatların %98.3'ünün siyah *Aspergillus* olduğunu bildirmişlerdir. Siyah *Aspergillus* izolatların %82.5'ini *Aspergillus niger* aggregate, %12.5'ini *Aspergillus japonicus*, %3.3'ünü ise *Aspergillus carbonarius* olarak tanımlamışlardır. CYA besiyerinde 12 *Aspergillus carbonarius* izolatının tamamının, *Aspergillus niger* aggregate izolatlarının ise %42.8'inin OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Chiotta & ark., (2009) 2006 ve 2007 hasat sezonunda Arjantin'in sekiz üzüm bölgesindeki 50 bağdan topladıkları üzüm örneklerinin *Aspergillus Nigri* kontaminasyonunu değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri izolatların %81'inin *Aspergillus niger* aggregate, %11'inin *Aspergillus carbonarius* türünün ve %8'inin ise unserie izolatlar oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen izolatların CYA besiyerinde %32'sinin (284'ün 91'i) 0.5 ile 1285 ng/g arasında değişen konsantrasyonlarda OTA üreticisi olduğunu belirlemişlerdir. OTA üreticisi 91 izolattan 63 tanesinin (%69) *Aspergillus niger* aggregate ve 28 tanesinin (%31) ise *Aspergillus carbonarius* olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettikleri unserie izolatların ise OTA üretmediğini bildirmişlerdir.

Lucchetta & ark., (2010) İtalya'nın dört bölgesinde bulunan 23 bağdan 2003–2007 hasatları sırasında topladıkları üzüm örneklerinin %70'inin *Aspergillus* cinsi üyeleri ile kontamine olduğunu bulmuşlardır. Üzüm örneklerinin %30'un da ise OTA'nın mevcut olduğunu belirlemişlerdir.

Mikušová & ark., (2010) Slovakya'nın en önemli altı şarap üretim bölgesinin üçünden 2008 yılında olgunlaşmanın iki farklı döneminde topladıkları üzümlerin mikrofungus kontaminasyonunu değerlendirmişler. Sonuç olarak 437 izolat elde etmişler ve elde ettikleri izolatların %10.3'ünün *Aspergillus carbonarius*, %9.15'inin *Aspergillus niger*, %5.7'sinin *Aspergillus uvarum* ve %1.14'ünün *Aspergillus citrinum* olduğunu tespit etmişlerdir.

Lasram & ark., (2012) Tunus'taki 4 farklı bölgede bulunan toplam 24 üzüm örneğini 2005, 2006 ve 2007 yıllarında toplamışlar ve siyah *Aspergillus* kontaminasyonu açısından değerlendirmişler.

Değerlendirme sonucunda toplam 1242 izolat aldıklarını ve bu izolatların 934 tanesinin *Aspergillus niger* aggregate, 270 tanesinin *Aspergillus carbonarius* ve 29 tanesinin uniseriate türleri olduğunu belirlemişlerdir. *Aspergillus carbonarius* izolatlarının 270 tanesinin ve *Aspergillus niger* aggregate izolatlarının ise sadece 29 tanesinin OTA üreticisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Medina & ark., (2012) İspanya'da yetiştirilen beş üzüm çeşidini içeren 52 örnekte *Aspergillus Nigri* kontaminasyonun %82'sinin olduğunu bulmuşlardır. Elde ettikleri 120 *Aspergillus carbonarius* izolatından 89 tanesinin 1.2 ile 3530 ng/ml ve 21 *Aspergillus tubingensis* izolatından 3 tanesinin 46.4 ile 111.5 ng/ml arasında değişen konsantrasyonlarda OTA ürettiğini tespit etmişlerdir. Elde ettikleri 64 *Aspergillus niger* izolatının ise OTA üretmediğini bildirmişlerdir.

Chunmei & ark., (2013) Çin'de Shaanxi eyaletinde yetiştirilen 5 çeşit şaraplık ve üç çeşit yemeklik üzüm bağından topladıkları sağlam ve çürük üzüm örneklerini değerlendirmişler. Elde ettikleri 7 cinse ait toplam 187 izolattan 12 tane *Aspergillus* izolatının OTA ürettiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada elde ettikleri 5 *Aspergillus carbonarius* izolatının 2274–13179 ng/g, 3 *Aspergillus niger* aggregate izolatının 17.38–82.31 ng/g, 1 *Aspergillus ochraceus* izolatının 98.9 ng/g, 1 *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* izolatının 6.31–13.46 ng/g, 1 *Aspergillus melleus* izolatının 17.24 ng/g ve son olarak 1 *Aspergillus wentii* izolatının 3.93 ng/g OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

TanÄ inovÄ, MaÅ & BarborÄ, (2014) 2011 yılında Slovak menşeli şaraplık üzümlerden topladıkları 20 üzüm örneğinin

Aspergillus kontaminasyonunu değerlendirmişler. Üzümlerden 33 *Aspergillus* izolatu elde ettiklerini, bu izolatların ise 10 tanesinin *Aspergillus clavatus*, 8 tanesinin *Aspergillus niger* aggregate, 3 tanesinin *Aspergillus fumigatus*, 3 tanesinin *Aspergillus versicolor* ve 1 tanesinin ise *Aspergillus flavus* türleri olduğunu, 8 izolatu ise diğer *Aspergillus* türleri olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Felšöciová & ark., (2015) Slovakya’da ViniÄky’daki Tokaj şarap bölgesindeki Furmint, Lipovina ve Yellow muscat şaraplık üzümlerinden 2012 yılı Kasım hasadı sırasında üç örnek toplamışlar ve mikrofungus kontaminasyonunu değerlendirmişlerdir. *Aspergillus* kontaminasyonunun %1.1 olduğunu ve elde ettikleri 5 izolatu *Aspergillus* section *Nigri* ve 4 izolatu ise diğer *Aspergillus* türleri olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen 5 *Aspergillus* section *Nigri* izolatu da OTA üreticisi olduğunu bulmuşlardır.

García-Cela & ark., (2015) İspanya’nın iki farklı tarımsal iklim bölgesindeki 14 bağdan 2011 ve 2012 yıllarında örnekleme yapmışlar ve elde ettikleri mikrofungus izolatlarının %30’unun *Aspergillus* cinsi üyeleri olduğunu belirlemişlerdir. Elde ettikleri izolatları *Aspergillus candidus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus paraciticus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus wentii* ve *Aspergillus westerdijkiae* olarak tanımlamışlardır. *Aspergillus carbonarius* izolatlarının 4 ile 18696 ng/g, *Aspergillus niger* izolatlarının 8 ile 119 ng/g *Aspergillus tubingensis* izolatlarının 5 ile 475 ng/g arasında değişen konsantrasyonlarda OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Garmendia & Vero (2016) iki yıllık süre ile Uruguay'da yetişen Tannat cinsi üzüm örneklerini 7 bağdan toplamışlar siyah *Aspergillus* cinsi üyeleri ile kontaminasyonunu değerlendirmişlerdir. Üzüm örneklerinden elde ettikleri izolatların %6'sının *Aspergillus* cinsi üyeleri olduğunu ve bu izolatlardan 57 tanesinin siyah *Aspergillus* cinsi üyeleri olduğunu tespit etmişlerdir. Tanımladıkları 28 *Aspergillus welwitschiae* izolatından %64'ünün CYA besiyerinde 4.1 ± 0.2 ile 191.0 ± 4.0 ng/g arasında değişen konsantrasyonlarda OTA ürettiğini belirlemişlerdir.

Einloft & ark., (2017) Brezilya'nın güney eyaleti yetiştirilen iki çeşit şaraplık üzümünden 2011 yılında erken olgunlaşma ve hasat aşamasında örnekler almışlar. Sonuç olarak 1811 adet mikrofungus izolatı elde etmişler ve bunlardan sadece 25 tanesinin *Aspergillus* cinsi üyeleri olduğunu belirlemişlerdir. 25 izolatın 22 tanesinin siyah *Aspergillus* olduğunu tespit etmişler ve Serra do Sudeste'de olgunlaşma döneminden elde ettikleri 1 unserieate *Aspergillus* izolatının 148 ng/ml OTA ürettiğini bulmuşlardır.

Freire & ark., (2017) 2014 yılında Brezilya'nın yarı kurak tropik bölgesindeki dört adet beyaz ve yedi adet kırmızı şaraplık üzüm bağından hasat döneminde topladıkları üzüm örneklerinden 466 adet mikrofungus izolatı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu izolatların %75.3'ünün (351) ise *Aspergillus* cinsi üyeleri olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri *Aspergillus* izolatlarının %35.33'ünü *Aspergillus niger*, %33.90'ını *Aspergillus carbonarius*, %20.51'ini *Aspergillus aculeatus*, %8.83'ünü *Aspergillus niger* aggregate, %1.14'ünü *Aspergillus flavus* ve %0.28'ini ise *Aspergillus sojae* olarak tanımlamışlardır. 346 izolatın %32.1'inin OTA ürettiği, OTA üreten türün ise *Aspergillus carbonarius* olduğunu

bulmuşlardır. *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus niger* aggregate izolatlarının ise OTA üretmediğini bildirmişlerdir.

Pantelides & ark., (2017) 2010 ve 2011 yıllarında hasat döneminde Kıbrıs'ın en önemli şarap üretim bölgesi olan Limasol ilçesinde 6 bağdan topladıkları üzüm örneklerinin %43.3'ünün *Aspergillus section Nigri* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri 284 izolatın %92.25'ini (262) *Aspergillus tubingensis*, %5.3'ünü (15) *Aspergillus niger* ve %2.1'ini (6) ise *Aspergillus welwitschiae*, sadece 1 izolatı (%0.35) ise *Aspergillus carbonarius* olarak tanımlamışlardır. İzolatların CYA besiyerinde OTA üretimlerini değerlendirdiklerinde ise, *Aspergillus carbonarius* izolatının ortalama 1436.1 ng/g, 3 *Aspergillus niger* izolatının ise 23.9 ng/g ve 1 *Aspergillus welwitschiae* izolatının ise 9.1 ng/g OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Oliveri & ark., (2017) Etna Dağı'ndaki (Doğu Sicilya, İtalya) 8 üzüm bağından iki yıl süre ile üzüm, toprak ve havadan topladıkları örneklerden 300 tane *Aspergillus niger* aggregate, 97 tane *Aspergillus carbonarius* ve 9 tane uniseriate izolat, toplamda 406 *Aspergillus Nigri* izolatı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Elde ettikleri 59 *Aspergillus carbonarius* izolatından 55 tanesinin, 78 *Aspergillus niger* izolatından 21 tanesinin, 10 *Aspergillus tubingensis* izolatından 3 tanesinin ve 9 *Aspergillus japonicus* izolatından 1 tanesinin OTA ürettiğini bulmuşlardır.

Huang & ark., (2020) Çin'de bulunan 13 bağdan topladıkları üzüm örneklerinden 345 adet *Aspergillus* izolatı elde etmişler. 137 Siyah *Aspergillus* izolatlarını ise kalmodulin gen dizilerine

dayanarak tanımlamışlar. İzolatların %48.7'sinin *Aspergillus tubingensis*, %20.6'sını *Aspergillus welwitschiae* ve %11'inin ise *Aspergillus aculeatinus* türleri olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen siyah *Aspergillus* izolatlarının %4.4'ünün OTA üreticisi olduğu ve OTA üretiminde sorumlu türün *Aspergillus carbonarius* olduğunu bulmuşlardır.

Özcan Ateş & Zorba (2020) 2015 ve 2016 yıllarında Bozcaada Çavuş ve Karalahna üzümünün bulunduğu 6 bağdan elde ettikleri mikrofungus izolatlarının %13.78'inin (312 tanesinin) *Aspergillus* cinsi üyeleri olduğunu belirtmişlerdir. Seçtikleri 6 izolatın (4 *Aspergillus niger*, 1 *Aspergillus calidoustus* ve 1 *Aspergillus sydowii*) ise 0.80-74.01 ng/g arasında OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

Özcan Ateş, Zorba & Şen (2024) 2015 ve 2016 yıllarında olgunlaşma sırasında Bozcaada Çavuş ve Karalahna üzümlerinden izole ettikleri *Aspergillus* izolatları *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger/welwitschia/awamori*, *Aspergillus welwitschia*, *Aspergillus spelaeus* ve *Aspergillus fructus* olarak tanımlamışlardır. Seçtikleri 6 izolatın OTA üretimlerini in vitro olarak değerlendirdiklerinde 2 *Aspergillus carbonarius* izolatının 49.448 ± 0.354 ve 12.483 ± 0.187 ppb, 1 *Aspergillus tubingensis* izolatının 32.884 ± 0.55 ve 3 *Aspergillus niger/welwitschia/awamori* izolatının ise 3.550 ± 0.240 , 7.519 ± 0.134 ve 92.346 ± 0.818 ppb OTA ürettiğini tespit etmişlerdir.

6. Sonuç

Bu derlemede literatürde farklı bölgelerde ve üzüm varyetlerinde yapılan çalışmalar dikkate alınarak üzümlerde bulunan

okratoksijenik *Aspergillus* türlerinin varlığı ve OTA üretimleri ile ilgili hakkında genel bir bilgi verilmesi amaçlanmıştır. Üzümlerdeki OTA kontaminasyonun genel olarak siyah *Aspergillus* türlerinden özellikle de *Aspergillus carbonarius* türünden kaynaklandığı belirlenmiştir. Üzümlerdeki mikrofungus kolonizasyonunu ve OTA üretimine yönelik biyolojik ve kimyasal farklı uygulamalar yapılmaktadır, fakat bu konular üzerine halen tartışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte okratoksijenik *Aspergillus* türlerinin üzümlerde hatta diğer gıdalarda dağılımı insan sağlığına olan olumsuz etkileri göz önüne alındığında her dönem önemli olan ve tartışması devam eden bir konudur. Günümüzde de etkileri hissedilen iklim değişikliğine bağlı olarak mikrofungusların üreme koşullarını etkileyen sıcaklık, bağıl nem, CO₂ miktarı ve güneş ışığı gibi çevresel koşullarda değişiklikler hayatta kalmalarını etkileyebilir. Bu da gelecekte mikotoksijenik mikrofungusların üremeleri ve dolayısıyla mikotoksin üretim şartlarının değişmesi anlamına gelmektedir. Sonuç olarak mikrofungus toplulukların çeşitliliği ve yapısı değişebilir. Bu nedenle üzüm ya da diğer gıda maddelerinde mikrofungus kontaminasyonunun takip edilmesi ve mikotoksin düzeyleri ile ilgili olarak çalışmaların sürekli yapılması, özellikle mikrofungusların mikotoksin üretme koşullarında değişiklik olup olmadığının belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (ÇOMU-BAP) tarafından Bağımsız Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir (Proje No: FBA-2019-3028).

KAYNAKLAR

Atar Selouane, S. Z., Bouya, D., Lebrihi, A. & Bouseta, A. (2009). Natural occurrence of ochratoxigenic *Aspergillus* species and ochratoxin a in Moroccan grapes. *World Applied Sciences Journal*, 7(3), 297–305.

Aydoğdu, H. & Güçer Y. (2009). Microfungi and Mycotoxins of Grape and Grape Products. *Trakia Journal of Sciences*, 7(2), 211–214.

Balajee, S. A., Houbraken, J., Verweij, P. E., Hong, S. B., Yaghuchi, T., Varga, J. & Samson, R. A. (2007). *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in Mycology*, 59, 39–46. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.05>

Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., & Kozakiewicz, Z. (2003). Occurrence of ochratoxin A–producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, 66(4), 633–636. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.4.633>

Bau, M., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Minguez, S. & Cabañes, F. J. (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.015>

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. & Lebrihi, A. (2006). Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *International journal of food microbiology*, 111, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.004>

Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M. L., Ramos, A. J. & Bragulat, M. R. (2006). Mycobiota and Ochratoxin A Producing Fungi From Spanish Wine Grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111(Supp. 1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.011>

Bellí, N., Marín, S., Duaigües, A., Ramos, A. J. & Sanchis, V. (2004). Ochratoxin A in Wines, Musts and Grape Juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 591–594.7 <https://doi.org/10.1002/jsfa.1702>

Bellí, N., Mitchell, D., Marín, S., Alegre, I., Ramos, A. J., Magan, N. & Sanchis, V. (2005). Ochratoxin A-Producing Fungi in Spanish Wine Grapes and Their Relationship with Meteorological Conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 113, 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-5547-4>

Bennett, J. W. (2010). An Overview of the Genus *Aspergillus*. Masayuki Machida & Katsuya Gom (Ed.) *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. (s. 1–17). Caister Academic Press. <https://www.caister.com/openaccess/pdf/aspergillus1.pdf>

Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Minguez, S. & Pons, A. (2002). What is The Source of Ochratoxin A in Wine?. *International Journal of Food Microbiology*, 79 (3), 213–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00087-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00087-9)

Chiotta, M. L., Ponsone, M. L., Combina, M., Torres, A. M., & Chulze, S. N. (2009). *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina.

International Journal of Food Microbiology, 136(1), 137–141.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.013>

Chunmei, J., Junling, S., Qi'an, H. & Yanlin, L. (2013). Occurrence of Toxin Production Fungi in Intact and Rotten Table and Wine Grapes and Related Influencing Factors. *Food Control*, 31(1), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.015>

Einloft, T. C., Hoeltz, M., Teixeira, T. R., Oldoni, V. P., Manfroi, V. & Noll, I. B. (2017). Survey of mycobiota, black *Aspergillus* and ochratoxin A occurrence on Brazilian wine grapes. *Annals of Microbiology*, 67(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1236-0>

El-Khoury, A. E., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M. L., & Lebrihi, A. (2008). Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine–grapes and musts. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), 2244–2250. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.026>

Felšöciová, S., Rybarik, L., Tančinová, D., Mašková, Z. & Kačániová, M. (2015). Microfungi and mycotoxins of grapes from eastern Slovak wine region. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(special issue 1 (Microbiology), 16–18 <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.special1.16-18>

Fleet, G. H. (1999). Microorganisms in Food Ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 101–117. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00080-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00080-X)

Freire, L., Passamani, F. R. F., Thomas, A. B., Nassur, R. D. C. M. R., Silva, L. M., Paschoal, F. N., Pereira, G. E., Prado, G. &

Batista, L. R. (2017). Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. *International journal of food microbiology*, 241, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.027>

García-Cela, E., Crespo-Sempere, A., Gil-Serna, J., Porqueres, A., & Marin, S. (2015). Fungal diversity, incidence and mycotoxin contamination in grapes from two agro-climatic Spanish regions with emphasis on *Aspergillus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(8), 1716–1729. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6876>

Garmendia, G. & Vero, S. (2016). Occurrence and biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* on ‘Tannat’ grapes in Uruguay. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.020>

Gray, D. J., Jyasankar, S. & Li, Z. (2005). *Vitis* Spp. Grape. Litz RE (ed) *Biotechnology of fruit and nut crops* (s. 672–706). Wallingford, Oxon: CABI.

Guzev, L., Danshin, A., Ziv, S. & Lichter, A. (2006). Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.003>

Houbraken, J. & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in mycology*, 70, 1–51. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>

Houbraken, J., de Vries, R. P. & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in applied microbiology*, 86, 199–249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Benscoter, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in mycology*, 95, 5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>

Huang, X., Xiao, Z., Kong, F., Chen, A. J., Perrone, G., Wang, Z., Wang, J. & Zhang, H. (2020). Diversity and ochratoxin A-fumonisin profile of black *Aspergilli* isolated from grapes in China. *World mycotoxin journal*, 13(2), 225–234. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2505>

Krijgsheld, P., Bleichrodt, R. V., Van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J. & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 74, 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>

Lasram, S., Belli, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V. & Ghorbel, A. (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 114(3), 376–379. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.027>

Lasram, S., Oueslati, S., Mliki, A., Ghorbel, A., Silar, P. & Chebil, S. (2012). Ochratoxin A and ochratoxigenic black

Aspergillus species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. *Food Control*, 25(1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.006>

Leong, S. L., Hocking, A. D. & Scott, E. S. (2007). *Aspergillus* Species Producing Ochratoxin A: Isolation from Vineyard Soils and Infection of Semillon Bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 124–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03056.x>

Lucchetta, G., Bazzo, I., Cortivo, G. D., Stringher, L., Bellotto, D., Borgo, M. & Angelini, E. (2010). Occurrence of black aspergilli and ochratoxin A on grapes in Italy. *Toxins*, 2(4), 840–855. <https://doi.org/10.3390/toxins2040840>

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. & Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37(2), 179–184. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01376.x>

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8(7), 191. <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>

Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F. M. & Jiménez, M. (2005). Study of Spanish Grape Mycobiota and OchratoxinA Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, Aug, 4696–4702. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4696-4702.2005>

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A. & Mliki, A., (2007). Occurrence of Pathogenic Fungal Species in Tunisian Vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.022>

Mikušová, P., Ritieni, A., Santini, A., Juhasová, G. & Šrobárová, A. (2010). Contamination by moulds of grape berries in Slovakia. *Food Additives and Contaminants*, 27(5), 738–747. <https://doi.org/10.1080/19440040903571754>

Oliveri, C., Bella, P., Tessitori, M., Catara, V. & La Rosa, R. (2017). Grape and environmental mycoflora monitoring in old, traditionally cultivated vineyards on Mount Etna, southern Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 65–73. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7683>

Özcan Ateş, G. & Zorba, N. N. D. (2020). Determination of Mycobiota and Microbial Loads of Grapes Grown in Bozcaada, Turkey. *Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences*, 2020, 899–906. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.5.899-906>

Özcan Ateş, G. (2021). *Aspergillus* Ve İnsan Sağlığı İnsan Sağlığı Açısından Önemi. Dr. Öğr. Üyesi Onur KARAMAN (Ed.). Sağlık & Bilim: Medikal Araştırmalar-2 (s. 137–148). İstanbul: Efe Akademi.

Özcan Ateş, G. Zorba, N. N. D. & Şen, B. (2024). Biodiversity of ochratoxigenic *Aspergillus* species isolated from çavuş and karalahna grapes in Bozcaada, Türkiye. *Anatolian Journal of Botany*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.30616/ajb.1395701>

Pantelides, I. S., Aristeidou, E., Lazari, M., Tsolakidou, M. D., Tsaltas, D., Christofidou, M., Kafouris, D., Christou, E. & Ioannou, N. (2017). Biodiversity and ochratoxin A profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from wine grapes in Cyprus vineyards. *Food microbiology*, 67, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.010>

Pawar, N. V., Patil, V. B., Kamble, S. S., & Dixit, G. B. (2008). First Report of *Aspergillus niger* as a Plant Pathogen on *Zingiber officinale* from India. *Plant Disease*, 92(9), 1368–1368. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1368C>

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. & Samson, R. A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in mycology*, 59, 53-66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>

Pitt J.I. & Hocking A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer. DOI: 10.1007/978-0-378-92207-2.

Ponsone, M. L., Combina, M., Dalcero, A. & Chulze, S. (2007). Ochratoxin A and Ochratoxigenic *Aspergillus* Species in Argentinean Wine Grapes Cultivated Under Organic and Non-Organic Systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.001>

Raper, K. B. & Fennell, D. I. (1965). *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.

Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R. R. M., Lima, N. & Venâncio, A. (2007). Identification and

Characterization of *Aspergillus flavus* and Aflatoxins. Méndez-Villas, A. (Ed.). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (s. 1527–534). Formatex

Sage, L., Garon, D. & Seigle-Murandi, F. (2004). Fungal Microflora and OchratoxinA Risk in French Vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5764–5768. <https://doi.org/10.1021/jf049497c>

Sage, L., Krivobok, S., Delbos, É, Seigle-Murandi, F. & Creppy, E. E. (2002). Fungal Flora and Ochratoxin A Production in Grapes and Musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1306–1311. <https://doi.org/10.1021/jf011015z>

Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frishad, J. C. & Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. Utrecht, The Netherland: CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre.

Samson, R. A., Noomin, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. C. & Varga, J., (2007). Diagnostic Tools To Identify Black *Aspergilli*. *Studies In Mycology*, 59, 129–145. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2007.59.13>

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi T. & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. & Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in

Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00085-0)

Serra, R., Braga, A. & Venâncio, A. (2005). Mycotoxin-Production and Other Fungi Isolated from Grapes for Wine Production, with Particular Emphasis on Ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156, 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.12.005>

Serra, R., Mendoça, C. & Venâncio A. (2006). Ochratoxin A Occurrence and Formation in Portuguese Wine Grapes at Various Stages of Maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.007>

TanÄ inovÄ, D., MaÄ, Z. & BarborÄ, Z. (2014). Species of genus *Aspergillus* on grape Slovak origin. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 3(special issue 1 (Microbiology)), 291–293. <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/7615>

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I. & Magan, N. (2018). *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>

Tian, J., Wang, Y., Zeng, H., Li, Z., Zhang, P., Tessema A. & Peng X. (2015). Efficacy and Possible Mechanisms of Perillaldehyde in Control of *Aspergillus niger* Causing Grape Decay. *International Journal of Food Microbiology*, 202, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.022>

Tjamos, S. E., Antoniou, P. P. & Tjamos, E. C. (2006). *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.044>

Valero, A., Begum, M., Hocking, A. D., Marín, S., Ramos, A. J. & Sanchis V. (2008). Mycelial Growth and Ochratoxin A Production by *Aspergillus* Section *Nigri* on Simulated Grape Medium in Modified Atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 372–379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03760.x>

Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J. & Sanchis V. (2007). Effect of Preharvest Fungicides and Interacting Fungi on *Aspergillus carbonarius* Growth and Ochratoxin A Synthesis in Dehydrating Grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 194–199. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02168.x>

Varga, J. & Kozakiewicz, Z. (2006). Ochratoxin A in Grapes and Grape Derived Products. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.007>

Wang, Y., Zeng, X., Zhou, Z., Xing, K., Tessema, A., Zeng, H. & Tian, J. (2015). Inhibitory Effect of Nerol against *Aspergillus niger* on Grapes through a Membrane Lesion Mechanism. *Food Control*, 55, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.029>

Zöllner, P. & Mayer-Helm, B. (2006). Trace Mycotoxin Analysis in Complex Biological and Food Matrices by Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Ionisation Mass

Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136, 123–169.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.055>

BÖLÜM V

Pankreas ve Akciğer Kanserlerinde Fare Modeli Uygulamaları

Aybike SARIOĞLU BOZKURT
Onur ONGUNCAN

Giriş

Globocan (Global Cancer Observatory) 2022 verilerine göre akciğer kanseri görülme sıklığı ve mortalitesi ile ilk sırada, pankreas kanseri ise görülme sıklığı ile 12. mortalitesi ile 6. sırada yer almaktadır. Bu iki ölümcül ve yaygın kanser türünde hastaların %50'sine hastalığın ileri evresinde tanı konulmakta ve sıklıkla erken evre terapötik tedavi sonrasında nüksetme görülmektedir. Özellikle pankreas kanseri gibi kompleks organ kanserlerinde organın moleküler biyolojisinin anlaşılmasında, teşhisinde, evrelendirilmesinde ve erken evre tümörleri olanlara yönelik yeni tedavilerin geliştirilmesinde önemli ilerlemeler olmasına rağmen, pankreas kanserinin önlenmesi, erken teşhisi ve tedavisinde çok az ilerleme kaydedilmiştir.

İlaç verilebilir hedeflerin, yolların ve yeni ilaç kombinasyonlarının araştırılmasıyla yeni terapötik adayların sayısı artarken, klinik olarak onaylanan ilaçların sayısı aynı oranda artmamaktadır. Akciğer ve pankreas kanseri hastalarına yönelik, yeni tedavilerin değerlendirilebilmesi için daha etkin bir ilaç geliştirme modeline ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ilaç geliştirme modeli, klinik öncesi testlerden faz II veya III klinik çalışmalara kadar uzanan ve insanlar için tavsiye edilen dozların belirlenebilmesi için yinelenen bir dizi klinik öncesi çalışmayı içermelidir. Bu sebeple farklı hasta geçmişlerini temsil eden in vivo hastalık modellerinden veya tümör genetiği veya moleküler profillerine dayalı seçilmiş hasta alt popülasyonlarından elde edilen verilerle oluşturulmuş modellerde tedavi denenmelidir (Calles, Rubio-Viqueira & Hidalgo, 2013). Bugüne kadar birçok farklı çalışmada insan tümör modellemeleri denenmiş; özellikle de farelerin kullanıldığı modeller, klinik testlerden önce anti-kanser etkinliğini ve toksisitelerini tahmin etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Bu amaç için en yaygın olarak kullanılan in vivo preklinik kanser modelleri arasında genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO'lar), insan tümör hücre hatlarından türetilen ksenograftlar, doğrudan bağışıklık yetersizliği olan farelere ksenotransplante edilen insan tümör biyopsileri ve insan mikro ortamına sahip hümanize modeller yer alır (Voskoglou-Nomikos, Pater & Seymour, 2003; Sharpless & Depinho, 2006; Shultz, Ishikawa & Greiner, 2007; Garber, 2009; Perez-Mancera & ark., 2012). İnsanlarda ilacın etkinliğini ve tolere edilebilirliğini tahmin etmede fare modellerinin değeri konusunda önemli tartışmalar olmuştur (Takimoto, 2001; Tentler & ark., 2012). Hastalarda ilacın öngörülebilirliği açısından, ksenograft modeller

hastanın tümörünü daha iyi temsil ettiğinden klinik yanıtı tahmin etmede değerli bir araçtır. Bununla birlikte, hücre hatlarından türetilen deri altı ksenograftlar, belki de klinik etkinlik sırasında yaşanan daha yüksek seçim baskısından kaynaklanan hücrelerin daha homojen ve farklılaşmamış histolojisinden dolayı genellikle düşük öngörülebilirlik sergiler (Rubio-Viqueira & Hidalgo, 2009). Ek olarak bu modeller, in vivo olarak uygun şekilde aktarıldığında, biyolojik çalışmalar için önemli bir tümör materyali kaynağı sağlayabilir ve akciğer ve pankreas tümörlerinden küçük miktarlarda insan biyopsisi elde etmede sıklıkla karşılaşılan sınırlamaların üstesinden gelebilir. Bu kitap bölümünde sık kullanılan fare modelleri ve oluşturulma yöntemleri geçmiş çalışmalar baz alınarak genel hatlarıyla açıklanmıştır.

1.1. Pankreas Kanserinde Fare Modellemeleri

Pankreas kanserinde de ana modellemeler farelerdir ve bugüne kadar farklı modellemeler üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

1.1.1. Kanserojen Kaynaklı Modellemeler

Farede değil ancak Suriye altın hamsterlarında 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine (DPHN) deri altı uygulanarak morfolojik ve biyolojik olarak insandakine benzer pankreas tümörleri oluşturulabilmiştir. Üç farklı grup oluşturulmuş ve her grupta sırasıyla 125,250, 500mg/kg dozlarda DPHN uygulanmıştır. Pankreatik neoplazmların genel insidansı %100 olarak ölçülmüş ve %51'inin çapı 2 ila 20 mm arasında değişim gösterdiği bildirilmiştir. Çoğu tümör pars cranialiste meydana gelirken pars dextra ve corpusta daha az sayıda en az ise pars sinistrada gözlenmiştir. Birkaç hayvanda mide, dalak, karaciğer gibi çevre dokulara invazyonlar

gözlenmiştir. Yapılan histolojik inceleme vakaların sadece %6'sının pars cranialis ile sınırlı olduğunu çoğu vakada çoklu neoplazmların pankreas boyunca dağıldığı görülmüştür. DPHN uygulanan bu hayvanlarda 15 hafta gibi erken bir dönemde tümör oluşumu gözlenmiştir. İnsanlardakine benzer şekilde her iki cinsiyette de eşit sıklıkta görülmüştür. Bu çalışmada pankreas kanserlerinin çoğu çoklu kökenli olup pankreasın farklı anatomik bölgelerine dağılmıştır. Ayrıca yine insandaki bulgulara benzer şekilde, indüklenen karsinomlar çoğunlukla duktal kökenli ve daha az sıklıkla asiner hücre tipindedir. İnsan kanseriyle benzerlik gösteren diğer noktalar ise kilo kaybı, asites, yaygın metastazlar ve yağ nekrozudur. Deneyin 44. Haftasında son DPHN uygulanan hayvan öldüğünde deney bitirilmiştir (Pour & ark.,1975).

Yapılan başka bir çalışmada ise kanseri indüklemek için bu kez 7,12-dimethyl1,2-benzanthracene (DMBA) kullanılmıştır. Median laparotomi ile giriş yapılmış ve kolon duodenumdan dikkatlice kesilerek pankreas ortaya çıkarılmıştır. Devamında 1 mg DMBA pankreatik cebe implante edilmiştir. DMBA'nın bu implantasyon bölgesinden emin olunduktan sonra hayvanlar 30,60 ve 90 gün boyunca bu kanserojene maruz bırakılmıştır. Ancak 40.günden sonra ölümlerin artması nedeniyle 90.gün grubundaki hayvanlar da 60 günlük gruba dahil edilmiştir. Bu 2 grup karşılaştırıldığında 60 gün boyunca DMBA'ya maruz kalanların kanser prevalansında 2,26 kat artış görülmüştür. Tüm farelerde karsinom ve intraepitelyal lezyonların bir arada görülmesi ve farelerin %83'ünde pankreatik intraepitelyal neoplazilerin görülmesi DMBA'nın farelerde insan pankreatik karsinogenezinin benzer patolojik bulgularını yeniden ürettiği kavramını desteklemekte ve

güçlendirmektedir. DMBA'nın karsinogenezi indüklemesi pankreas dokusunda DNA eklentileri oluşturmaya ve özellikle ras onkogen gibi tümör baskılayıcı genlerde mutasyon oluşturmaya bağlıdır. Yapılan başka çalışmalarda da DMBA bu çalışmaya ve insan kanserine benzer sonuçlar vermiştir. Sonuç olarak DMBA modeli, uygun bir hayvan türünde pankreas kanserini incelemek için yararlı bir strateji olabilir (Osvaldt & ark., 2006).

1.1.2. Pankreas Kanserinde Sinjenik Modeller

Radyasyon veya kemoterapi gibi immunoterapi temelli yaklaşımlar ve bunların neden olduğu immünolojik değişikliklerin anlaşılabilmesi ancak immunkompetan farelerde mümkündür. Bu doğrultuda da sinjenik/allograft modellerin kullanımına gereksinim vardır (Mallya & ark., 2021). Radyasyon ve lokal anti CD-40'ın pankreas kanserinde etkili bir in situ aşı oluşturmaya araştırmasında sinjenik Panc02 veya KPC hücreleri, sırasıyla 2×10^5 veya $1,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde vahşi tip C57BL/6 farelerin her iki flank bölgesine deri altından aşılanmıştır. 2-3 hafta sonra tümörler palpe edilebilir boyuta ulaşmış ve araştırma başlamıştır (Karim & ark., 2018). Sinjenik fare modelleri deri altına subkutan olarak uygulanabildiği gibi ortotopik olarak pankreas içine de uygulanabilir. Çünkü subkutan modelde implante edilen tümör kendi doğal ortamında büyümediği için etkinliği ortotopik modele kıyasla sınırlıdır. Yapılan başka bir çalışmada murin pankreatik adenokarsinom hücre hattı 6606PDA ve Panc02 ortotopik olarak aşılanmıştır. Karın boşluğu 1,5 cm genişliğinde transversal laparotomi ile hafif sağa bakan şekilde açılmıştır. Pankreasın başı tespit edilip bir pamuk yardımıyla kaldırılmıştır. Lokal yayılımındaki farklılıkları ve tümör hücresi yayılımına bağlı lokal ekstrapankreatik

tümör oluşumunu test etmek amacıyla bir gruba $2,5 \times 10^5$ canlı tümör hücresi 20 mikrolitre PBS ile diğer gruba ise yine aynı sayıda tümör hücresi bu kez 20 mikrolitre matrigel ile verilmiştir. Hücreler pankreas başına yavaşça enjekte edilip sonrasında pankreas tekrar karın boşluğuna yerleştirilmiştir. Çalışma sonunda Panc02 hücre hattı 6606PDA tümörlerine kıyasla daha büyük tümörler geliştirmiştir. Panc02 daha invaziv ve düzensiz bir yayılım paterni gösterirken, 6606PDA daha küresel bir büyüme paterni ve merkezi bir nekroz bölgesi göstermiştir. Karaciğer ve akciğere metastatik lezyonlar her iki hücre grubunda da nadiren gözlenmiş (%4) ancak ince ve kalın bağırsak, mide ve yine karaciğer gibi komşu organlarda farelerin %30'unda invazyon gözlenmiştir. Matrigel ile enjekte edilen tümöre sahip fareler diğer gruba kıyasla daha uzun bir sağkalım süresine sahipti. Bunun da nedeni enjeksiyon sırası veya sonrasında peritoneal yayılımının artmasıyla açıklanmaktadır (Partecke & ark., 2011). Yapılan başka bir çalışmada 10^4 hücre pankreasa veya farelerin yan tarafına enjekte edilmiş ve FOLFIRINOX isimli ilaca cevapları karşılaştırılmıştır. Ortotopik tümörler daha hızlı gelişmiş ve boyut olarak daha büyük bir hale ulaşmıştır. Yine aynı şekilde ortotopik tümörler ilaca daha duyarlıydı ve boyutlarında daha fazla azalma, apoptozda ise artış rapor edilmiştir (Erstad & ark., 2018). Fare kaynaklı pankreatik kanser hücre hatları PC1, WDPaCa, PDPaCa, HPC, HP1, HaP-T1, H2T, HPD (1-3) NR, Pan02, 6606PDA'dır (Kong & ark., 2020).

1.1.3. Pankreas Kanserinde Ksenograft Modeller

Ksenograft modelde de sinjenik modelde olduğu gibi ortotopik veya heterotopik uygulamalar yapılabilir. Nude veya SCID farelerin kullanıldığı bu sistemde heterotopik model genellikle arka

bacakların arka veya üst kısmı boyunca deri altındaki cilde sadece doku veya hücrelerin implante edilmesiyle oluşturulabilir. $1-2 \times 10^7$ /ml'ye ayarlanan hücre süspansiyonu implantasyon bölgesine (sırt, boyun, koltuk altı, kasık veya zengin kan ve lenfatik damar kaynağı olan diğer bölgeler) 0.2 ml hacminde enjekte edilir (Kong & ark., 2020). Ancak subkutan modeller genellikle yaygın lokal büyüme gösterir ve insandaki pankreas kanseri davranışının aksine nadiren metastaz yapar. Ayrıca viseral organlarda tümör büyümesi sonucu ortaya çıkabilecek bulgu ve semptomları taşımaz. Genellikle Panc1, MIA PaCa, AsPC-1, Capan-1 ve Capan-2 ve BxPC-3 hücre hatları en yaygın kullanılanlardır. Ortotopik model daha karmaşık ve zor oluşturulmasına rağmen yerel ve uzak kanser bölgelerini taklit etmek ve incelemek için daha doğru bir yapı sunar (Ding & ark., 2010). Dalak silüetinin hafifçe sol medialinde olan sol abdominal flank kesi yeri olarak seçilir. Karın derisinde 1 cm'lik kesi yapılır ve alttaki organlara zarar vermeden karın boşluğuna girebilmek için kas üzerinde yine 1 cm'lik bir ensizyon yapılır. Devamında dalakla beraber tüm pankreas gövdesi dışarı çekilir ve peritonun dışına çıkarılmış olur. Bir sütür kullanarak pankreas kuyruğunu çevreleyen bir düğüm atılır. İğne bu düğümden pankreas kuyruğuna sokulur ve pankreas başına doğru ilerletilir. İğneyi geri çekerken hücre süspansiyonu yavaşça enjekte edilir. İnsan pankreas hücre hatları için serumsuz PBS gibi ortamlarda 5×10^5 ila 1×10^6 hücrenin tek bir inokülasyonu tümör oluşumu için yeterlidir (Qiu & ark., 2013). Bu şekilde hücreleri doğrudan pankreasa enjekte etmek metastatik potansiyele sahip hücre popülasyonları açısından nispeten yüksek bir başarı oranı göstermiştir (Ding & ark., 2010). Doğrudan pankreasa hücrelerin enjekte edilmesinin dışında ana pankreatik

kanala da enjeksiyon yapılabilir. Orta üst karın hattından bir kesi yapılarak duodenum ve pankreas başının dikkatlice ortaya çıkarıldığı bir çalışmada xPA1-RFP hücreleri 1×10^6 /50 ml şeklinde ortak safra kanalına enjekte edilmiş ve %100 tümör alma oranı elde edilmiştir (Tsuji & ark., 2010). İnsan pankreatik hücre hatları orjin dokuya göre farklılık göstermektedir. AsPC-1 ve HPAF-II asites, HPAC-1, MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC-3, Capan-2 primer tümör, Capan-1, Su.86.86, CFPAC-1, Suit-2 karaciğer metastazı, SW1990 dalak metastazı, Hs766T, Colo357, T3M4 lenfatik metastaz kaynaklıdır (Kong & ark., 2020).

1.1.4. Pankreas Kanserinde PDX Modeller

Enjeksiyon yöntemlerine bir alternatif olarak solid yani katı tümör parçasının dikişlerle pankreasa tutturulması gibi metotlar da denenmiştir. Bu parça 1 mm^3 'lük boyutlarda olabilir. Bu işlemden birkaç hafta sonra fare pankreası üzerinde 2-3 cm çapında katı bir kitle fark edilmiştir. Bu katı kitle hem orijinal tümörün histolojik görünümünü hem de tümörle ilgili antiijenlerin ekspresyonunu korumuştur ancak tümörün pankreasa dikişlerle tutturulması inflamatuvar bir yanıtı neden olabilir. Dikişin yarattığı bu travmatik etkiden kaçınmak için pankreasın kendisinin döndürülerek tümör etrafına sarıldığı bir yöntem geliştirilmiş ancak bu yöntemde de normal anatomik pozisyonun değişmesi gibi handikaplarla karşılaşmıştır. Sütür kullanımını ve pankreasın anatomik konfigürasyonunun değiştirilmesini gerektirmeyen son geliştirilen yöntemde küçük tümör parçaları pankreas parankimi içinde mikrocerrahi kullanılarak hazırlanan pankreas ceplerine implante edilmiştir. Bu yaklaşım sonunda da yine %100 tümör alma oranı elde edilmiştir (Hotz & ark., 2000; Capellá & ark., 1999). Bu model

bireysel hastalardaki tümör özelliklerini yansıttığı için bireyselleştirilmiş tedavi çalışmaları için gerekli ve önemlidir. Tüm bu avantajlarına rağmen her modelde olduğu gibi sahip olduğu bazı dezavantajlar bu yöntemin uygulanmasını kısıtlamaktadır. Bu dezavantajların başında döngü süresinin uzun olması ve pankreas kanserinin en tipik özelliklerinden biri olan stromal hücrelerin farelere aktarıldıktan sonra yerini insan stromasından yavaş yavaş fare stromasına dönüştürmesi yer almaktadır (Kong & ark., 2020).

1.1.5. Pankreas Kanserinde GEMM Modelleri

GEMM modelleri özellikle diğer modellerde görülen eksiklikleri gidermeyi amaçlayan bir modeldir. Genetiği değiştirilmiş fareler insan pankreas kanserinde önemli rol üstlenen onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde spesifik gen mutasyonlarının eklenmesiyle oluşturulur. Böylelikle pankreas kanseri farede tekrarlanır. Bu doğrultuda yapılmış en iyi genetiği değiştirilmiş fare modeli onkojenik KRAS ve tümör baskılayıcı Trp53 mutasyonlarını içeren ve her ikisi de embriyonik gelişimin erken bir aşamasından itibaren pankreasın tüm hücrelerinde ifade edilen pankreasa özgü bir Cre, Pdx1-Cre transgeni tarafından yönlendirilen KPC faresidir. İnsan hastalığının birçok özelliğini tekrarlayan bu modellerde ağrı ve kaşeksi gibi çoğu bulgu sergilenebilir. İnsanlarda pankreas kanseri gelişimini hızlandırdığı düşünülen obezite, yüksek yağlı veya kalorili diyet ve pankreatit gibi risk faktörleri bu modeller üzerinde denenebilir (Krempley & Yu, 2017). Günümüzde insan kanserinin birçok yönünü yansıtabilen çeşitli neoplastik lezyonlar ve kanser üretmek için kullanılan geniş bir gen ve hücre hedefleri havuzu vardır. Bu genlerin aktarımında transgenез, knockin/knockout teknolojisi için embriyo manipölasyonu ve somatik hücrelere retroviral verilmesi gibi uygulamalar kullanılmaktadır. Bugüne kadar belirli genlerin pozitif ekspresyonuna dayalı olarak 7 farklı hücre tipi hedeflenmiştir. Bunlar elastaz (EL), sitokeratin 19 (CK19), Pdx1, p48/ptf1a (p48),

Mist1, nestin ve keratin 5'tir (Ding & ark., 2010). Kanser gelişimindeki erken olayların takip edilebilmesi ve bu sayede erken terapötik müdahalelerin test edilebilmesi en büyük artıları olsa da potansiyel tedaviyi zamanlamadaki zorluk, maliyeti ve fazla sayıda hayvan gerektirmesi ve de transgen ekspresyonu ile birleşen hücresel yolakların koalterasyonları bu model üzerinde sınırlayıcı etkiye sahiptir (Killion, Radinsky & Fidler, 1998).

1.1.6. Pankreas Kanseriinde Organoid Modeller

Organoid modellerin hastalar arası varyasyonu yakalayıp koruması, hasta materyalini yüksek verimlilikte ksenotransplante etmesi, ilgili hastanın ilaç yanıtına cevabını aslına uygun şekilde tekrar edebilmesi gibi çeşitli avantajları vardır (Kong & ark., 2020). Farelerdeki pankreatik duktal adenokarsinomadan ve duktal intraepitelyal neoplazilerden izole edilen hücreler organoid şeklinde kültürlenebilmiştir. Belli koşulların değiştirilmesi ile benzer bir model insan için de uygulanabilir (Boj & ark., 2015). Organoid modeller cerrahi olarak tümörün rezeke edilmesiyle yapılabileceği gibi ince iğne aspirasyonu ile çok daha sınırlı bir materyalden de gerçekleştirilebilir. Bu iki yöntemin karşılaştırıldığı araştırmalarda izolasyon ve sonrasındaki çoğaltma oranlarında önemli bir farklılık görülmemiş ve kanserin tüm aşamalarından organoid model oluşturulabildiği gösterilmiştir (Tiriach & ark., 2019).

2.1. Akciğer Kanseriinde Modellemeler

Diğer kanser türlerinde de olduğu gibi akciğer kanserinde de fare temel hayvan modelidir. Genetik çeşitliliğin genişliği, genetik manipülasyonun kolaylığı, akciğer hastalığını moleküler ve histolojik benzerliklerle indükleyebilme yeteneği fareyi yine temel model haline getirmiştir.

2.1.1. Akciğer Kanserinde Kansorejen Kaynaklı Modellemeler

4-(metilnitrosoamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK), Urethane, Benzo(a)pyrene, N-Nitrosobis-(2- cloroethyl) ureas, Dimethylhydrazine, DiethylNitrosamine, EthylNitrosourea 3-, Methylchholanthrene gibi çeşitli karsinojenle indüklenmiş fare model çalışmaları vardır. Tütün karsinojeni olan NNK için dişi ovariektomize FVB/N farelerde 4 hafta boyunca haftada iki kez olmak koşuluyla intraperitoneal enjeksiyon başına 3mg uygulanmıştır (Stabile & ark., 2018). Üretranla yapılan bir çalışmada fareler 16,28,40 ve 50 hafta sonra öldürülecek şekilde dört gruba ayrılmıştı. 5-7 haftalık A/J cinsi farelere %0,9 salin içinde 1 mg/g vücut ağırlığı dozunda tek bir intraperitoneal üretran enjeksiyonu yapıldıktan sonra bahsedilen haftalarda fareler öldürülüp akciğerleri diseke edilmiş ve tümör oluşumları değerlendirilmişti. Sırasıyla çok küçük adenom, küçük adenom, orta büyüklükte adenom ve büyük adenom/adenokarsinoma karşılık geldiği görülmüştür (Ohno & ark., 2001). Benzo(a)pyrene 7 haftalık A/J farelere uygulanmış ve R15777 gibi farnesiltransferaz inhibitörünün kanserin tedavisindeki ve önlemedeki etkinliği araştırılmıştır. Benzo(a)pyrene 0,2 ml kornoil içinde 100 mg/kg 'a tek bir intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulanmış 4 veya 14 hafta sonra da ilaç verilip tümör üzerindeki etkileri raporlanmıştır (Gunning & ark., 2003). Benzo(a)pyrene'nin intratrakeal verildiği çalışmalar da vardır. Otuz farelik deney grubuna 8 hafta boyunca haftada bir kez olacak şekilde 0,025 ml salin solüsyonu içinde 1,0 mg benzo[a]piren ve 0,5 mg kömür tozu intratrakeal olarak uygulanmıştır. Bu işlem için enjektör neredeyse tracheanın bifürkasyonuna kadar itilmiştir (Yoshimoto & ark., 1977). 3-metilkolantren (MCA)'ın intratrakeal enjeksiyonu

sonucunda bronşiyal ağaç boyunca invazif ve metastatik akciğer skuamöz hücreli karsinoma (LUSC'ye) ilerleyen metaplastik lezyonlara rastlanmıştır (Hynds & ark., 2021). İntraperitoneal ve intratrekeal yöntemden farklı olarak topikal uygulanan karsinojenler de mevcuttur. Dişi İsviçre farelerinde (Cr.NIH(S)) N-nitroso-metilbis-kloroetilüre (NMBCU) veya N-nitroso-trischloroethylurea (NTCU) topikal (deri) uygulamasından sonra bronşiyoler hücre hiperplazisi, displazi metaplazisi ve çeşitli morfolojik tiplerde bronşiyoler hücre tümörleri gelişmiştir. Bu bileşikler, farelerde sistemik olarak bronşiyoler hücre tümörlerini yüksek oranda indüklediği tespit edilen ilk bileşiklerdir. Her bir farenin interskapular bölgesinde ufak bir alan tıraş edilip kıllardan iyice arındırıldıktan sonra o bölgeye 25 mikrolitre damla 0,04 mol/l (molar) NMBCU veya NTCU17 aseton içinde uygulanmıştır. NMBCU kullanılan farelerin çoğunda 45 haftalıkken pulmoner tümörler görülmüş, NTCU'ya maruz kalanlarda ise 34 haftalıkken tümör oluşumunun başladığı kaydedilmiştir. Ayrıca NTCU grubu farelerin daha büyük bir neoplastik yüke sahip olduğu da yapılan analizler sonrasında bildirilmiştir. NMBCU grubunun %58'inde NTCU grubunun %74'ünde akciğer tümörü tespit edilirken en sık rastlanılan tümör tipleri skuamöz hücreli karsinomlar ve adenoskuamöz karsinomlar olup, bunları sekretuar hücreli veya sekretuar hücresiz adenokarsinomlar ve tek bir siliyer hücreli tümör takip etmiştir (Rehm & ark., 1991). Asbest içeren havaya maruz bırakılan 127 farenin %46'sında akciğer tümörü görülürken bunların %18'inde birden fazla tümör oluşumu olmuştur (Shimkin & Stoner, 1975).

2.1.2. Akciğer Kanserinde Sinjenik Modeller

İmmünolojik açıdan uyumlu kanser hücrelerinin immünolojik açıdan uyumlu farelere enjeksiyonu ile gerçekleştirilen bu yöntemin oluşturulması oldukça zor ve kısıtlıdır. Bugüne kadar akciğer kanseri için geliştirilmiş olan tek sinjenik model Lewis akciğer karsinomudur. Bu hücre dizisi oldukça tümörojeniktir ve metastaz yeteneği nedeniyle metastaz çalışmalarında da kullanılabilir (Üstüner & Entok, 2019). Farklı şekillerde farelere uygulanabilmektedir. Örneğin erkek C57BL farelerinde 2×10^6 tümör hücresi bacaklara deri altından nakledilmiş ve 7 gün sonra 100 mm^3 hacme ulaşmıştır (Herbst, Takeuchi & Teicher, 1998). C57B1 erkek 6-8 haftalık farelerin kullanıldığı çalışmada nihai konsantrasyon 2×10^7 hücre/fare olacak şekilde ayarlanmış ve sağ bacağına bu kez deri altı değil intramuskuler olarak uygulanmıştır (Papageorgiou & ark., 2000). C57B6 farelerine başka bir çalışmada ise 1×10^7 dozunda periton boşluğuna enjekte edilmiştir (Sakai & ark., 2006). Başka bir çalışmada subkutan enjeksiyona alternatif olarak 5×10^4 hücre lateral kuyruk venine enjekte edilmiştir (Schumacher & ark., 2013). Hedefe yönelik tedavilerin ve tümör büyümesi açısından gerçek immun ve toksisite yanıtların değerlendirilmesi önemli avantajlar gibi gözüktüğü de bir murin sisteminde değerlendirilen yanıtlar tam olarak insan koşullarına aktarılamayabilir (Kellar, Egan & Morris, 2015).

2.1.3. Akciğer Kanserinde Ksenograft Modeller

Nude veya SCID gibi immun yetmezlikli farelerde adenokarsinom oluşturmak için yaygın kullanılan hücre hatları, K-Ras ve EGFR mutasyonlarının bir spektrumunu temsil eden A549, H1975, HCC4006 ve HCC827'dir. Bunlar içinde tutunma olasılığı en yüksek olan A549'dur. NCI-H1299, NCI-H460 ve NCI-H226

hücre hatları ise sırasıyla karsinom, büyük hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinomu modellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Subkutanöz ve endobronşiyal enjeksiyon yöntemlerinin uygulanabildiği bu modellerde genellikle 10^6 - 10^7 hücre sayısı gerekirken tümör büyümesi için geçmesi gereken optimum zaman da 1-8 haftadır (Kellar, Egan & Morris, 2015). Endobronşiyal enjeksiyon için bir çalışmada şu şekilde bir yol izlenmiştir: Supraklavüler çentiğin üzerindeki trachea bölgesinde 1 cm'lik ventral orta hat ensizyonu yapılır. Tracheayı çevreleyen glandüler dokuların küt diseksiyonla ayrılmasından sonra kasların kılıfının diseksiyonu gerçekleştirilir ve trachea açığa çıkarılmış olur. İğne sağ ana gövde bronşuna ilerletilir. Enjekte edilen içeriğin sağ akciğerin distal hava yollarında kalmasını sağlamak için hayvanlar ters Trendelenberg pozisyonunda tutulmuştur (McLemore & ark., 1987). Subkutan uygulamaların çoğunda metastaz görülmezken endobronşiyal uygulama ile verilen A549 ve NCI-H460 hücrelerinde sol akciğere, dalağa ve karaciğere metastaz saptanmıştır (Kellar, Egan & Morris, 2015). İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı A549'un intratracheal uygulandığı bir çalışmada 6×10^5 veya 3×10^6 A549 hücresinin enjeksiyonu, intratrakeal tümör implantasyonundan 15 hafta sonrasına kadar görünür tümörler oluşturmamıştır. Ortotopik tümör implantasyonundan 60 gün sonra yalnızca %20'lik bir tümör gelişimi olması dozun sınırlı ve yetersiz olduğunu düşündürmüştür (Kang & ark., 2006).

2.1.4. Akciğer Kanserinde PDX Modeller

Primer tümör veya metastatik tümörler birçok laboratuvar da ortotopik veya subkutan PDX murin modeli oluşturulmak için kullanılmıştır ve %23-90 arasında değişen engraftman oranlarına

sahiptir (Morgan & ark., 2017). Yapılan bir çalışmada 5 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastasından tümör dokusu elde edilmiş ve immun yetmezlikli farelerin subrenal kapsülüne implante edilerek 48 adet hasta kaynaklı tümör ksenograft modeli oluşturulmuştur. Daha önce yapılan çoğu çalışmada kıyılmış dokular kullanılırken bu çalışmada hassas kesilmiş doku dilimleri kullanılmıştır. Bu dokuların bir kısmı taze olarak hemen farelere implante edilirken bir kısmı aşılama öncesi 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂'de spesifik organotipik destekler üzerinde kültürlenmiştir. Ksenograftlar orijinal tümör özelliklerini korurken bu iki grup arasında da bir farka rastlanılmamıştır. İmplantasyondan sonraki ilk aşamada greft sağkalımı için önemli bir özellik olan zengin vaskülaritenin gelişmesi için oldukça avantajlı olan renal kapsülün kullanıldığı bu çalışmada skuamöz hücreli karsinomunun adenokarsinomdan daha yüksek engraftman oranına sahip olduğu raporlanmıştır (Russo & ark., 2015).

2.1.5. Akciğer Kanseri GEMM Modelleri

Tipik olarak onkogenik allelleri ekspres eden veya otokton tümörler oluşturmak için tümör baskılayıcı genleri silmek üzere genetik olarak manipüle edilmiş inbred fare suşlarının kullanıldığı genetiği değiştirilmiş fare modellerini türetmek uzun zaman alırken özellikle insan akciğer kanserinde önemli bir yer tutan tütün kullanımının sebep olduğu genomik hasardan yoksun olması nedeniyle insan tümörlerinin mutasyonel çeşitliliğini yakalayamazlar. Ancak çeşitli kimyasalların ya da sitozin deaminaz gibi mutasyonlara yol açtığı bilinen proteinlerin ekspresyonunun neden olduğu ek mutajenezin dahil edilmesi bu modelleri insan tümörigenezine biraz daha yaklaştırmaktadır. Yine de fare ömrünün

kısa olması ve telomer biyolojisinin insandan farklı olması GEMM tümörlerinin insan tümörleriyle aynı evrimsel geçmişe tabi olmadığı anlamına gelmektedir. KHDAK GEMM'lerinin çoğu adenokarsinom ile sonuçlanırken genellikle Kras mutasyonlarının sebep olduğu modeller üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. En yaygın kullanılan KrasG12D olup adenokarsinomlar, Sftpc veya Scgb1a1 (CCSP; CC10) eksprese eden AT2 hücrelerinde Kras-G12D ekspresyonu ile üretilebilir (Hynds & ark., 2021).

2.1.6. Akciğer Kanseriinde Organoid Modeller

3D kültür teknolojilerinin son zamanlardaki hızlı gelişimi yetişkin kök hücrelerin ve primer kanser hücrelerinin in vitro ortamda daha fizyolojik koşullarda uzun süreli kültürlenmesine olanak sağlamış ve bu da organoid modelleri temel ve translasyonel kanser araştırmalarında önemli bir araç haline getirmiştir. LUSC için ana köken hücreler bazal hücrelerdir. Bazal hücre türevli organoidler bu nedenle LUSC'yi hem in vivo hem in vitro temelli araştırmada önemlidir. Yapılan çalışmalarda ortotopik olarak akciğerlere enjekte edilen dönüştürülmüş bazal hücrelerin LUSC'ye neden olduğu görülmüştür. CRISPR/Cas9 genomik temelli bir çalışmada, LUSC'ye özgü tümör baskılayıcı genlerin silinmesi ile çoklu fare akciğer bazal organoidlerinden tümör oluşumu potansiyelini karakterize etmiştir (Pan & ark., 2021; Hai & ark., 2020).

KAYNAKÇA

Boj, SF., Hwang, C., Baker, LA., Chio, IIC., Engle, DD. Corbo, V. & et al. (2015). Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 160(1-2):324-38. Doi: 10.1016/j.cell.2014.12.021.

Calles, A., Rubio-Viqueira, B. & Hidalgo, M. (2013). Primary Human Non-Small Cell Lung and Pancreatic Tumorgraft Models—Utility and Applications in Drug Discovery and Tumor Biology. *Current protocols in pharmacology*, 61(1),14-26. Doi:10.1002/0471141755.ph1426s61.

Capellá, G., Farré, L., Villanueva, A., Reyes, G., García, C., Tarafa, G. & Luís, F. (1999). Orthotopic models of human pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci*; 880:103-9. Doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09514.x.

Ding, Y., Cravero, J.D., Adrian, K. & Grippo, P. (2010). Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas*, 39(3), 283-92. Doi:10.1097/MPA.0b013e3181c15619

Erstad, D.J., Sojoodi, M., Taylor, M.S., Ghoshal, S., Razavi, A.A., O'Regan, K.A.G., Bardeesy, N., Ferrone, C.R., Lanuti, M., Caravan, P., Tanabe, K.K. & Fuchs, B.C. (2018). Orthotopic and heterotopic murine models of pancreatic cancer and their different responses to FOLFIRINOX chemotherapy. *Dis Model Mech*, 11(7),dmm034793. DOI: 10.1242/dmm.034793.

Garber, K. (2009). From human to mouse and back:“Tumorgraft” models surge in popularity. *J. Natl. Cancer Inst.* 101:6-8. Doi: 10.1093/jnci/djn481.

Gunning, WT., Kramer, PM., Lubet, RA., Steele, VE., End, DW., Wouters, W. & Pereira, MA. (2003). Chemoprevention of benzo(a)pyrene-induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. *Clin Cancer Res*,9(5):1927-30.

Hai, J., Zhang, H., Zhou, J., Wu, Z., Chen, T., Papadopoulos, E. & et al. (2020). Generation of Genetically Engineered Mouse Lung Organoid Models for Squamous Cell Lung Cancers Allows for the Study of Combinatorial Immunotherapy. *Clin Cancer Res*; 26(13),3431-3442. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1627

Herbst, RS., Takeuchi, H. & Teicher, BA. (1998) Paclitaxel/carboplatin administration along with antiangiogenic therapy in non-small-cell lung and breast carcinoma models. *Cancer Chemother Pharmacol*,41(6):497-504. Doi: 10.1007/s002800050773.

Hotz, HG., Hines, OJ., Foitzik, T. & Reber, HA. (2000). Animal models of exocrine pancreatic cancer. *Int J Colorectal Dis*,15:136–143. Doi: 10.1007/s003840000229.

Kang, Y., Omura, M., Suzuki, A., Oka, T., Nakagami, Y., Cheng, C. & et al. (2006). Development of an orthotopic transplantation model in nude mice that simulates the clinical features of human lung cancer. *Cancer Sci*; 97(10):996-1001. Doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00276.x.

Karim, S.Y., Bruck, P.T., Moreau, M., Kunjachan, S., Chen, G.Z., Kumar, R., Grabow, S., Dougan, S.K. & Ngwa, W. (2018). Radiation and Local Anti-CD40 Generate an Effective in situ

Vaccine in Preclinical Models of Pancreatic Cancer. *Front Immunol*, 9, 2030. Doi: 10.3389/fimmu.2018.02030.

Kellar, A., Egan, C. & Morris, D. (2015). Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *Biomed Res Int* 2015; 2015:621324. Doi: 10.1155/2015/621324.

Killion, JJ., Radinsky, R. & Fidler, IJ. (1998). Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev*;17(3):279-84. Doi: 10.1023/a:1006140513233.

Kong, K., Guo, M., Liu, Y. & Zheng, J. (2020). Progress in Animal Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Cancer*,11(6), 1555–1567. Doi: 10.7150/jca.37529.

Krempley, BD. & Yu, KH. (2017). Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chin Clin Oncol* 2017;6(3):25. Doi: 10.21037/cco.2017.06.15.

Mallya, K., Gautam, S.K., Aithal, A., Batra, S.K. & Jain, M. (2021). Modeling pancreatic cancer in mice for experimental therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*,1876(1),188554. Doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188554.

McLemore, TL., Liu, MC., Blacker, PC., Gregg, M., Alley, MC., Abbott, BJ. & et al. (1987). Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer Res* 1987; 47(19):5132-40.

Morgan, KM., Riedlinger, GM., Rosenfeld, J., Ganesan, S. & Pine, SR. (2017). Patient-Derived Xenograft Models of Non-

Small Cell Lung Cancer and Their Potential Utility in Personalized Medicine. *Front Oncol*; 7:2. Doi: 10.3389/fonc.2017.00002.

Ohno, J., Horio, Y., Sekido, Y., Hasegawa, Y., Takahashi, M., Nishizawa, J., Saito, H., Ishikawa, F. & Shimokata, K. (2001). Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development. *Carcinogenesis*; 22(5):751-6. Doi: 10.1093/carcin/22.5.751.

Osvaldt, A.B., Wendt, L.R., Bersch, V.P., Backes, A.N., Schumacher, R.C.A., Edelweiss, M.I.A. & Rohde, L. (2006). Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. *Surgery*, 140(5),803-9. Doi: 10.1016/j.surg.2006.02.012.

Papageorgiou, A., Stravoravdi, P., Sahpazidou, D., Natsis, K., Chrysogelou, E. & Toliou, T. (2000). Effect of navelbine on inhibition of tumor growth, cellular differentiation and estrogen receptor status on Lewis lung carcinoma. *Chemotherapy*; 46(3):188-94. Doi: 10.1159/000007277.

Partecke, L.I., Sendler, M., Kaeding, A., Weiss, F.U., Mayerle, J., Dummer, A., Nguyen, T.D., Albers, N., Speerforck, S., Lerch, M.M., Heidecke, C.D., von Bernstorff, W. & Stier, A. (2011). A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *Eur Surg Res*, 47(2),98-107. Doi: 10.1159/000329413.

Perez-Mancera, P.A., Guerra, C., Barbacid, M. & Tuveson, D.A. (2012). What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology* 142:1079-1092. Doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.002.

Pour, P., Mohr, U., Cardesa, A., Althoff, J. & Krüger, F.W. (1975). Pancreatic neoplasms in an animal model: morphological, biological, and comparative studies. *Cancer*, 36(2), 379-89. Doi: 10.1002/1097-0142(197508)36:2<379::aid-cncr2820360213>3.0.co;2-r.

Rehm, S., Lijinsky, W., Singh, G. & Katyal, SL. (1991). Mouse bronchiolar cell carcinogenesis. Histologic characterization and expression of Clara cell antigen in lesions induced by N-nitrosobis-(2-chloroethyl) ureas. *Am J Pathol*; 139(2):413-22.

Rubio-Viqueira, B. & Hidalgo, M. (2009). Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 85:217-221. Doi: 10.1038/clpt.2008.200.

Russo, MV., Favarsani, A., Gatti, S., Ricca, D., Gobbo, AD., Ferrero, S. & et al. (2015). A New Mouse Avatar Model of Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*; 5: 52. Doi: 10.3389/fonc.2015.00052

Sakai, Y., Sasahira, T., Ohmori, H., Yoshida, K. & Kuniyasu, H. (2006). Conjugated linoleic acid reduced metastasized LL2 tumors in mouse peritoneum. *Virchows Arch*; 449(3):341-7. Doi: 10.1007/s00428-006-0249-7.

Schumacher, D., Strilic, B., Sivaraj, KK., Wettschureck, N. & Offermanns, S. (2013). Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell*; 24(1):130-7. Doi: 10.1016/j.ccr.2013.05.008.

Sharpless, N.E. & Depinho, R.A. (2006). The mighty mouse: Genetically engineered Mouse models in cancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:741-754. Doi: 10.1038/nrd2110.

Shimkin, MB. & Stoner, GD. (1975). Lung tumors in mice: application to carcinogenesis bioassay. *Adv Cancer Res* 1975; 21:1-58. Doi: 10.1016/s0065-230x(08)60970-7.

Shultz, L.D., Ishikawa, F. & Greiner, D.L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* 7:118-30. Doi: 10.1038/nri2017.

Stabile, L.P., Farooqui, M., Kanterewicz, B., Abberbock, S., Kurland, B.F., Diergaarde, B. & Siegfried, J.M. (2018). Preclinical Evidence for Combined Use of Aromatase Inhibitors and NSAIDs as Preventive Agents of Tobacco-Induced Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 13(3),399-412. Doi: 10.1016/j.jtho.2017.11.126.

Takimoto, C.H. (2001). Why drugs fail: Of mice and men revisited. *Clin. Cancer Res.* 7:229-230.

Tentler, J.J., Tan, A.C., Weekes, C.D., Jimeno, A., Leong, S., Pitts, T.M., Arcaroli, J.J., Messersmith, W.A. & Eckhardt, S.G. (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol*, 9(6),338-50. DOI:10.1038/nrclinonc.2012.61.

Tiriac, H., Plenker, D., Baker, LA. & Tuveson, DA. (2019). Organoid models for translational pancreatic cancer research. *Curr Opin Genet Dev*; 54:7-11. Doi: 10.1016/j.gde.2019.02.003.

Tsuji, K., Yang, M., Jiang, P., Maitra, A., Kaushal, S., Yamauchi, K., Katz, MH., Moossa, AR., Hoffman, RM. & Bouvet,

M. (2006). Common bile duct injection as a novel method for establishing red fluorescent protein (RFP)-expressing human pancreatic cancer in nude mice. JOP; 7(2):193-9.

Üstüner, C. & Entok, E. (2019). Akciğer Kanseri Deneysel Modelleri. Nucl Med Semin; 5:40-48. Doi: 10.4274/nts.galenos.2019.0006

Qiu, W. & Su, GH. (2013). Development of Orthotopic Pancreatic Tumor Mouse Models. Methods Mol Biol; 980: 215–223. Doi: 10.1007/978-1-62703-287-2_11.

Voskoglou-Nomikos, T., Pater, J.L. & Seymour, L. (2003). Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. Clin. Cancer Res. 9:4227-4239

Yoshimoto, T., Hirao, F., Sakatani, M., Nishikawa, H. & Ogura, T. (1977). Induction of squamous cell carcinoma in the lung of C57BL/6 mice by intratracheal instillation of benzo[a]pyrene with charcoal powder. Gan; 68(3):343-52.

BÖLÜM VI

Akciğer Kanserinde İmmunoterapötik ve Nanomedikal Tedaviler

Fatma SEÇER ÇELİK¹

Giriş

Akciğer kanseri dünyada en sık görülen, yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip kanserlerden biridir (Forde & ark., 2022). Kanser hücrelerinin histolojisine göre akciğer kanseri öncelikle küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı (olmayan) akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. KHDAK en sık görülen alt tiptir ve tüm akciğer kanseri türlerinin %85-90'ını oluşturmaktadır. KHDAK, akciğer adenokarsinomu, akciğer skuamöz karsinomu ve büyük hücreli akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok histolojik alt tipten oluşur (Abdelaziz & ark., 2018). Evre I veya II KHDAK'nin tedavisi,

¹ Dr. Öğr. Üye., Ankara Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara/Türkiye, Orcid: 0000-0001-5619-8958, bio.secer@gmail.com

adjuvan tedaviyle birlikte tümörün cerrahi rezeksiyonudur. Hastalık evre III veya IV'e ilerlediğinde tedavi kemoterapi veya radyoterapiye doğru kaymaktadır (Wathoni & ark., 2022; Mathieu & ark., 2023). Bununla birlikte, tüm geleneksel kemoterapötik ilaçlar, spesifik olmayan hedefleme, düşük biyoyararlanım ve kanser tedavisindeki etkinliklerini sınırlayan ilaç direncinin gelişimi de dahil olmak üzere aynı sınırlamalara sahiptir (Zhu & ark., 2021). Seçici özellikleri nedeniyle, nano-ilaç taşıma sistemi, yalnızca anti-kanser ilaçlarını tümör bölgelerine doğru bir şekilde iletmekle kalmayıp, aynı zamanda hedef dokuya spesifik olmayan zararı azaltan ve böylece anti-kanser etkinliğini artıran tedavi ajanlarının bozunmalarını önlemek için kapsüllemektedir (Pi & ark., 2022; Tang & ark., 2023; Rawal & ark., 2023). Nanotaşıyıcı bazlı ilaç dağıtımı, akciğer kanseri tedavisi için de etkin yeni bir stratejidir. Bunlar arasında ilaçların vücutta biyoyararlılığının arttırılması, anti-kanser ilaçların sahaya spesifik olarak verilmesi yoluyla artan güvenlik ve hedeflenen ilaç dağıtımı sırasında ilaçların sürekli ve kontrollü salınma kapasitesi ve sonuç olarak akciğer kanseri üzerindeki terapötik etkilerinin iyileştirilmesi yer almaktadır (Vanza, Patel & Patel, 2020; Kumar & Chawla, 2021; Habeeb & ark., 2022).

Nano-ilaç taşıma sistemi, akciğer kanseri tedavisi alanında keşfedilecek umut verici bir tedavi yaklaşımı olan, çoklu yan etkileri olan klasik kemoterapi tedavisine bir alternatif sunmaktadır (Iyer & ark., 2022; Subramaniam & ark., 2023). Moleküler hedefe yönelik tedavi, KHDAK için çok önemli bir tedavi stratejisi haline gelmiştir (Feng & Xiao, 2022). Moleküler hedefli tedaviler için hayati hedefler olarak görev yapan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), hepatosit büyüme faktörü reseptörü (c-Met) ve anaplastik

lenfoma kinaz (ALK) gibi çeşitli reseptör tirozin kinazlar hücre büyümesi ve hayatta kalmasında rol oynamaktadır (Schrank & ark., 2018; Lategahn, Keul & Rauh, 2018). Terapötik hedef olarak EGFR mutasyonu ile gefitinib ve erlotinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri, EGFR mutasyonlarını hedeflemek için geliştirilmiştir. Ayrıca diğer proteinleri hedef alan inhibitörlerin araştırmaları devam etmektedir (Imyanitov, Iyevleva & Levchenko, 2021). Her ne kadar moleküler hedefli tedavi stratejisi başlangıçta etkili olsa da, KHDAK'de terapötik etkinliği ciddi şekilde sınırlayan epigenetik değişiklik ve tümör heterojenitesi nedeniyle kazanılmış ilaç direnci sıklıkla kaçınılmaz olmaktadır (Romaniello & ark., 2020; Schneider, Lin & Shaw, 2023). Bazı durumlarda çoklu tedavilerin veya tedavi stratejilerinin immünoterapi ile birleştirilmesi tercih edilebilir (Zhao & ark., 2022; Passaro & Marinis, 2022). Akciğer kanserinin pek çok tedavi alternatifi olmasına rağmen hala zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu nedenle akciğer kanserine yönelik yeni ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu derlemenin amacı, akciğer kanseri tedavisine yeni bakış açıları ve anlayışlar sağlamayı umarak, akciğer kanseri için nano-ilac taşıma sistemi ve immünoterapiye ilişkin en son araştırmaları özetlemektir.

1. İmmünoterapi

İmmünoterapi akciğer kanseriyle mücadelede devrim niteliğinde bir yaklaşım sunmuştur. Bu tedavi yaklaşımı, immün kontrol noktası inhibitörleri (İKNI'ler), kanser aşılı ve hücre sel immünoterapiler gibi çeşitli yöntemleri içermektedir. Bu yöntemler, tümörlere karşı etkili bağışıklık reaksiyonları oluşturmayı veya geliştirmeyi hedeflemektedir. Özellikle kemoterapiyle karşılaştırıldığında immünoterapinin daha az yan etki gösterdiği ve

yalnızca hastaların hayatta kalma süresini uzatmakla kalmayıp aynı zamanda yaşam kalitelerini de iyileştirdiği gösterilmiştir (Yan & ark., 2022; Valencia & ark., 2022). İmmünoterapinin güvenli ve etkili olması akciğer kanserinin tedavisi için potansiyel bir strateji olduğunu göstermektedir (Yu & ark., 2019).

1.1.Aşılar

Kanser aşısı, çeşitli malign tümörlerin tedavisinde etkili yöntemlerden biridir (Hannani & ark., 2023). FRAME-001, evre III-IV KHDAK'nin tedavisi için etkili, kişiselleştirilmiş bir aşıdır (Oosting & ark., 2022). Bağışıklık sisteminin spesifik uyarılmasına dayanan terapötik kanser aşıları, anti-tümör bağışıklık tepkilerini artırabilmektedir (Gu & ark., 2022). Tümör özgülükleri nedeniyle, kanser hücrelerinden gelen mutasyona uğramış neoantijenler, anti-tümör immün tepkilerini tetikleme konusunda güçlü hedeflerdir ve kişiselleştirilmiş terapötik kanser aşılarının geliştirilmesi için, T hücre aracılı immünitenin en önemli uyarıcısıdır (Ott & ark., 2020; Award & ark., 2022). Anti-PD-1/PD-L1 immünoterapisi ile birlikte MVA bazlı aşılar, KHDAK'nin kişiselleştirilmiş tedavisi için ilgi çekici bir seçenek olabilmektedir (McCann & ark., 2022). Bu aşılar, CD8+ ve CD4+ T hücrelerinin aktivasyonunu teşvik eden ve tümöre özgü T hücrelerini indükleyen, tümör hücrelerinin saptanmasına ve ortadan kaldırılmasına yardımcı olan, tümör hücreleriyle yüklü bir nano aşılardır (Ma & ark., 2021). Yapılan bir çalışmada, TLR7/8 agonistleri yüklü nanoemülsiyon adjuvanına sahip bir kanser aşısı anti-PD-1 immünoterapisi ile birleştirildiğinde, fare akciğer kanseri modelinde güçlü anti-tümör aktivitesi göstermiştir (Koh & ark., 2021). Oral olarak aktif bir glutamin antagonisti (JHU083), EGFR peptid aşıları ile kombinasyon halinde kullanıldığında adaptif T

hücre aracılı tümöre spesifik bağışıklık tepkilerini desteklemiştir ve EGFR kaynaklı fare akciğer kanserinde önemli bir anti-kanser etkinliği sergilemiştir (Huang & ark., 2022).

1.2.İmmün hücre infüzyon tedavisi

Hücresele immünoterapi, hastanın spesifik kanser antijenlerini tanımak için genetik olarak tasarlanmış, *in vitro* olarak genişletilebilen ve daha sonra antijene spesifik T hücre bağışıklığını uyarmak ve geliştirmek için hastaya enjekte edilebilen T lenfositlerini kullanan bir kanser immünoterapisi yaklaşımıdır (Blumenschein & ark., 2022). Bu bölümde kimerik antijen reseptörü T hücre terapisi ve tümör infiltrat lenfositler anlatılmıştır.

1.2.1. Kimerik antijen reseptörü T (CAR-T) hücre tedavisi

CAR-T hücre tedavisi, hücresele immünoterapi alanında umut verici bir tümör tedavisidir ancak KHDAK'deki etkinliği tatmin edici değildir. Bu sınırlı etkinliğin temel nedenlerinden biri antijen hedeflerinin eksikliğidir (Wallstabe & ark., 2019; Jie & ark., 2021). KHDAK hastalarında yüksek oranda eksprese edilen akciğere özgü X'e (LunX) dayanarak, LunX'i hedef alan ve LunX-pozitif tümör hücrelerini öldürebilen bir CAR-LunXT hücresi tasarlanmıştır (Hu & ark., 2020). DLL 3'ü hedef alan bir CAR, fare akciğer kanseri modelinde anti-tümör etkinliği göstermiştir (Jaspers & ark., 2023). Bununla birlikte, heterojenlik ve tümör mikro çevresi (TMÇ) nedeniyle CAR-T hücresi terapisi, katı tümörlerin tedavisinde engel oluşturmaktadır. Lokal tedavi ve CAR-T hücresi immünoterapisinin kombinasyonu, TMÇ'yi modüle edebilir ve katı tümörlerde CAR-T lenfositlerinin anti-kanser kapasitesini artırabilir. Mikrodalga ablasyonu TMÇ'yi yeniden şekillendirmiş ve AXL-CAR-T

hücrelerinin anti-tümör etkinliğini arttırmıştır (Cao & ark., 2022). Çift fototermal-nanokatalitik özelliklere sahip nanoenzimler, tümör mikro ortamını yeniden şekillendirebilir ve yalnızca B7-H3 CAR-T hücrelerinin aktivasyonunu ve infiltrasyonunu arttırmakla kalmaz, aynı zamanda CAR-T hücrelerinin katı tümörlere karşı terapötik engellerini de aşmaya yardımcı olmaktadır (Zhu & ark., 2021).

1.2.2. Tümör İnfiltrate Lenfositler (TİL'ler)

TİL'lerin adaptif hücre transferi (AHT), immün kontrol noktası inhibitörleriyle tedavi edilen dirençli KHDAK hastalarında klinik etkiler göstererek TİL-AHT'e yeniden ilgi gösterilmesine yol açmıştır (Shah & ark., 2022). *In vitro* genişletildiğinde, TİL'ler tümör hücrelerini öldürme kapasitesine sahiptir (Lipp & ark., 2022). PIK-93 ve anti-PD-L1 antikollarının kombinasyonu, TİL'lerin toplanmasını arttırmış ve tümör büyümesini inhibe etmiştir (Lin & ark., 2023). Etkinlik ve güvenlik profilleri göz önüne alındığında, TİL'ler metastatik akciğer kanseri için yeni bir terapötik strateji olabilir (Creelan & ark., 2021).

1.3.Akciğer kanseri immünoterapisinde onkolitik virüsler (OV'ler)

Onkolitik virüsler, tümör hücrelerini seçici olarak çözen ve aynı zamanda güçlü anti-tümör bağışıklığını aktive edebilen doğal veya tasarlanmış enfeksiyöz patojenlerdir (Sun & ark., 2022; Lahiri & ark., 2023). Onkolitik parainfluenza virüsü ve PM21-NK hücreleri, akciğer kanserinin uyarlayıcı tedavisi için büyük potansiyele sahiptir (Varudkar, Oyer & Copik, 2021). Onkolitik influenza avirus enfeksiyonu ve B7-H3 immün kontrol noktası inhibitörünün kombinasyonu, akciğer kanseri üzerinde sinerjistik onkolitik ve immün düzenleyici etkiler ortaya koymuştur (Maseman

& ark., 2021). IL-10 ve onkolitik adenovirüs Ad-hTERT kombinasyonu, tümördeki CD8+ T hücrelerinin sayısını artırarak, anti-Lewis akciğer kanserinin iyileştirilmesinde önemli bir etki göstermiştir (Chen & ark., 2021). Hücre dışı veziküllerde kapsüllenen onkolitik adenovirüs ve paklitaksel, insan akciğer kanserinin hayvan ksenograft modellerinde tümör büyümesini azaltmıştır (Garofalo & ark., 2018). Düşük doz sisplatin ile kombine edilmiş değiştirilmiş bir onkolitik miksuma virüsü, immün hücre infiltrasyonu ile ilişkili sitotoksiteyi indüklemiş ve akciğer kanseri hastalarında hayatta kalma oranını önemli ölçüde artırmıştır (Kellish & ark., 2019).

1.4.Akciğer kanserine karşı immün kontrol noktası inhibitörleri (İKNİ'ler)

Akciğer kanserinin tedavisine yönelik İKNİ'ler, PD-1, PD-L1, sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein (CTLA-4) ve diğer inhibitörlerin kullanımı dahil olmak üzere bir dizi ajanı kapsamaktadır (Wang & ark., 2023). Akciğer kanseri tedavisinde bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerine dayanan ve güçlü anti-tümör aktivitesi gösteren çok sayıda klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. İlginç bir şekilde, immün kontrol noktası inhibitörlerinin tedavisi altında, tümörü boşaltan lenf düğümülerinin benzersiz bir yanıt modeli vardır ve bu durum, akciğer kanseri için immünoterapinin etkinliğini potansiyel olarak arttırmak için kullanılabilir (Yang & ark., 2022). Ek olarak, statin ilaçları PD-L1 ekspresyonunu baskılayabilir ve immün kontrol noktası blokaj tedavisi ile statinlerin kombinasyonu, akciğer kanseri tedavisinin etkinliğini daha da artırabilmektedir (Mao & ark., 2022). Ayrıca, bir sistin/glutamat antiporter inhibitörü olarak erastin, anti-PD-L1'e

duyarlılığı artırabilir, böylece akciğer kanserinin ilerlemesini etkili bir şekilde engelleyebilir (Tang & ark., 2023). FOXM1 seçici küçük müdahaleci RNA yıkımı veya tiostrepton, KHDAK tümörlerinde PD-L1 ekspresyonunu önemli ölçüde aşağı doğru düzenleyebilmektedir. Hayvan çalışmaları bu tedavilerin tümör boyutunu azaltabileceğini göstermiştir (Madhi & ark., 2022). Bununla birlikte, bağışıklık kontrol noktası aktivitesinin aşağı regülasyonu, inflamatuvar yan etkilere yol açabilir ve İKNİ'ler tarafından artan bağışıklık aktivasyonu, sağlıklı dokulara zarar verebilir (Tiu & ark., 2022). Bu nedenle, KHDAK hastalarının tedavisinde İKNİ'lerin etkinliği ve güvenliği dikkatli bir değerlendirme gerektirmektedir (Zhang & ark., 2022).

2. Akciğer kanseri tedavisi için nano-ilaç taşıma sistemleri

Nanopartiküllerin yapısı, kolay yüzey modifikasyonu, anti-kanser ilaçların stabilitesinin artırılması, ilaçların kontrollü salınımı gibi özelliklere sahiptir (Mottaghitab & ark., 2019; Alvanegh & ark., 2021). Nanopartiküller, benzersiz özelliklerinden yararlanarak, anti-kanser ilaçlarını ve nükleik asitleri tümör dokularına iletmektedir ve bu durum yan etkilerini etkili bir şekilde azaltabilir ve terapötik etkinliği artırabilir. Bu bölüm, eksozomlar, polimer nanopartiküller, manyetik nanopartiküller, lipid nanopartiküller, polilaktik-ko-glikolik asit ve lipozomlar gibi çeşitli nanopartikül türlerine odaklanarak, nano-ilaç taşıma sistemleri yoluyla akciğer kanseri tedavisindeki önemi anlatılacaktır.

2.1.Eksozomlar

Eksozomlar, boyutları 30 ila 150 nm arasında değişen, iyi biyouyumluluk, stabilite ve nispeten düşük immünojenite

sergileyen, lipid çift katmanlarına sahip biyolojik olarak türetilmiş nano-taşıyıcılardır. Eksozomlar, etkili hedefe yönelik ilaç dağıtımını kolaylaştıran ve akciğer kanserinin hassas tedavisinde önemli bir rol oynayan kemoterapi ilaçlarını ve nükleik asitleri kapsüllemek için nano-taşıyıcı platform olarak ortaya çıkmaktadır (Xiao & ark., 2019; Jeong & ark., 2020; Li & Liu, 2021). Sudaki çözünürlüğünün zayıf olması nedeniyle, docetaxel'in (DTX) akciğer kanseri için klinik uygulaması sınırlıdır. Wang ve ekibi, güçlü anti-akciğer kanseri etkinliği sergileyen, 149,5 nm parçacık boyutunda EXO-DTX'i sentezlemiştir (Wang & ark., 2021). Ayrıca, yüksek güvenliği ve düşük toksisitesi nedeniyle adeno-ilişkili virüs (AAV), gen transferi için umut verici bir taşıyıcı olarak ortaya çıkmıştır. Geleneksel AAV ile karşılaştırıldığında AAVExo, KHDAK ve KHAK'de gen transferinin verimliliğini önemli ölçüde arttırmıştır (Liu & ark., 2021). Sığır kolostrumundan elde edilen eksozomlar, paklitaksel (PAC) için taşıma araçları olarak kullanılmıştır ve folik asit (FA)-ExoPAC ile ağızdan uygulandığında genel terapötik etkinlik ve güvenlikte önemli bir artış olduğunu göstermiştir (Kandimalla & ark., 2021). Ek olarak, doksorubisin (DOX) ve vorinostat sağlamak için yeni bir tür yapay eksozom (AE) kullanılmıştır. AE sadece ilacın tümör dokularına dağıtımını kolaylaştırmakla kalmamış, aynı zamanda ilaçların tümör içinde tutulma süresinin uzatılmasına da katkıda bulunmuştur (Lin & ark., 2021). Eksozom aracılı miRNA tedavisi, KHDAK tedavisinde etkili bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Kemik iliği mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozom miRNA-193a, LRRC1'i hedefleyerek KHDAK'de sisplatin direncini azaltmış ve KHDAK DDP'ye dirençli hücrelerin apoptozunu arttırmıştır (Wu & ark., 2020). miRNA-126 (miRNA-231-Exo) ile

yüklenen 231-Exo, PTEN/PI3K/AKT sinyal yolunu keserek *in vivo* akciğer metastazını baskılama potansiyelini göstermiştir (Nie & ark., 2020). Ayrıca miR-7-5p'nin eksozom iletiminin, everolimusun anti-kanser etkisini arttırmak için MNK/eIF4E eksenini bloke etmede etkili olduğu kanıtlanmıştır. Böylece KHDAK'de MNK/eIF4E ve mTOR'un ikili inhibisyonunun kanser terapisinde sinerjistik etkiler sergileyebileceği gösterilmiştir (Liu & ark., 2022). miR-29a-3p yüklü eksozom/lipozom nanovesiküllerinin kullanılmasıyla kollajen I üretimini kısıtlamak mümkün olmuştur, sonuç olarak dolaşımdaki akciğer tümör hücreleri için prometastatik ortamın oluşumunu hafifletmek mümkün olmuştur (Yan & ark., 2022).

2.2. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller (PNP'ler) katı ve kolloidal miseller parçalarından oluşmaktadır ve nanoküreler, nanokapsüller ve polimer miseller olarak üç gruba ayrılabilir. Kemoterapi ilaçlarının taşıyıcıları olarak PNP'ler, düşük hücrel toksisiteye ve yüksek hücrel içselleştirme potansiyeline sahiptir, bu da onlara spesifik olarak akciğer kanseri hücrelerini hedeflemelerine ve hassas ilaç dağıtımını gerçekleştirmelerine olanak tanımaktadır (Soe & ark., 2019; Patel & ark., 2021). Biyobozunur triblok poli (etilen glikol)-poli (e-kaprolakton)- poli (etilen glikol) (PEG-PCL-PEG, PECE) polimerik nanopartiküller, sorafenib ve krizotinibin birlikte verilmesi için kullanılmıştır ve *in vivo* akciğer kanseri ilerlemesini etkili bir şekilde engellemiştir (Zhong & ark., 2021). Vinorelbin ve sisplatinin birlikte kapsülleyen bir lipozom polimer misel, KHDAK'yi tedavi etmek için ters buharlaştırma yöntemi kullanılarak geliştirilmiştir. Tümör taşıyan C57BL/6 farelerinde CoNP önemli anti-tümör etkinliği göstermiştir (Wang & ark., 2021). Bir tür pH'a

duyarlı lipid polimer karışık nanopartiküller (LPH NP'ler), erlotinib (ERL) ve bevacizumabın (BEV) birlikte verilmesi için hyaluronik asit (HA) ile değiştirilmiştir. HA-ERL/BEV-LPH NP'leri yüksek tümör dokusunda birikme kabiliyeti göstermiştir ve umut verici bir KHDAK tedavi sistemi olarak kullanılabilir (Pang & ark., 2020). Chen ve ekibi, nitroimidazol (NI) ve HA ile birlikte modifiye edilen ve sisplatin (DDP) ile yüklenen polimerik nanopartiküller (NI/HA-DDP-PNP'ler) ve lipid-polimer hibrit nanopartiküller (NI/HA-DDP-LPN'ler) geliştirmiştir. Deneysel sonuçlar, NI/HA-DDP-LPN'lerin ilaca dirençli insan akciğer kanseri A549/DDP hücrelerine karşı mükemmel anti-tümör etkileri sergilediğini ortaya çıkarmıştır (Chen & ark., 2020). Paklitaksel ve sisplatin taşıyan RGD ile modifiye edilmiş lipid-polimer nanopartikülleri, hem *in vivo* hem de *in vitro* dikkate değer anti-kanser etkinliği göstermiştir (Wang & ark., 2018). Regorafenib ve sisplatinin birlikte verilmesi için kullanılan amfifilik kopolimer nanopartiküllerin yenilikçi uygulaması, akciğer kanserinin ksenograft modelinde tolere edilebilir bir dozdan sonra akciğer kanseri ilerlemesinin sürekli inhibisyonunu göstermiştir (Zhou, 2020). Disülfid çapraz bağlı polimerler, cNGQ ile fonksiyonelleştirilmiş ve DTX ile yüklenmiştir, sonuç olarak A549 insan akciğer tümörlerinde $\alpha 3\beta 1$ integrinin aşırı ekspresyonunu etkili bir şekilde baskılayabilmiş ve tümör dokularında ilaç birikimini arttırmıştır (Zou & ark., 2020). Glutatyona duyarlı poliüretan nanopartikülleri, akciğer kanseri tümörlerinin *in vivo* büyüme hızını önemli ölçüde azaltabilmiştir (Iyer & ark., 2020).

2.3. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller (MNP'ler) manyetik ve süperparamanyetik özelliklere sahiptir. Biyouyumluluğa sahip

demir oksit bazlı manyetik nanopartiküller, manyetik rezonans görüntüleme ajanları ve demir ajanları olarak klinik kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır (Li & ark., 2019). Süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri (SPIONP'ler), güçlü penetrasyon kabiliyetine sahip olan T2-negatif kontrast maddeleri olarak manyetik rezonans görüntüleme için kullanılmaktadır (Huang & ark., 2018). Çok işlevli ilaç yüklü bir nanopartikül sistemi (F/A-PLGA@DOX/SPIO), akciğer kanseri hücrelerinde aşırı reaktif oksijen türlerinin üretimini desteklemiş, ardından hücre apoptozunu tetikleyerek anti-tümör etkisini artırmıştır (Gao & ark., 2018). Erlotinib preparatı (VT-287), *in vitro* olarak akciğer kanseri hücrelerini öldürebilen ve *in vivo* olarak akciğerlere ilaçları seçici olarak iletebilen manyetik NP'ler içermekte olup, böylece VT-287'yi akciğer kanseri için etkili ve güvenli bir tedavi olarak sunmaktadır (Kulkarni & ark., 2018).

2.4.Lipid Nanopartiküller

Lipid nanopartikülleri (LNP'ler), akciğerin biyolojik bariyerine nüfuz edebilen etkili bir ilaç taşıma sistemidir. LNP-siRNA formülasyonları güçlü gen susturma etkinliği göstermiştir (Zimmermann & ark., 2022). LNP'lerin miR-126–3p mimik ve miR-221–3p inhibitörünü kapsüllemesi, PIK3R2-AKT yolunu bloke ederek akciğer kanseri hastalarından türetilen ksenograftların büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır (Di Paolo & ark., 2021). Ayrıca, LNP'leri değiştirmek için lipit yüzeyine tümör hücresine özgü ligandların eklenmesi, miRNA'nın terapötik etkisini geliştirme ve toksisiteyi azaltma potansiyeline sahip olmuştur (Moro & ark., 2019). Katı lipit nanopartikülleri (SLN'ler), küçük boyut, geniş yüzey alanı, düşük toksisite, biyouyumluluk vb. gibi çok sayıda

benzersiz avantaja sahiptir (Nadaf & ark., 2022). PEGlenmiş katı lipid nanopartiküllerin kullanımı PTX'in anti-kanser potansiyelini geliştirebilir (Khatri & ark., 2020). PEGile edilmiş SLN, LDD sistemine D-a-Tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat içeren gefitinib ile yüklenmiştir, bu kombinasyonun bağırsakta kalma süresini arttırdığı ve gefitinib tarafından indüklenen akciğer kanseri hücrelerinin apoptozunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Sherif & ark., 2022). Katı lipite dayalı ikinci nesil koloidal taşıyıcılar olan nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC) gefitinib ve PTX ile yüklendiğinde *in vitro* insan akciğer kanseri hücrelerinde güçlü anti-kanser aktivite sergilemiştir (Majumder & Minko, 2021).

2.5.Poli (polilaktik-ko-glikolik asit) Nanopartiküller

Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), FDA tarafından onaylanmış, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir bir polimer olarak tanımlanmıştır. Kontrollü ve sürekli salım, yüksek ilaç yüklemesi ve mükemmel stabilite avantajlarına sahiptir. RGD reseptörü hedefli PLGA nanopartikülleri, akciğer kanseri tedavisinde sisplatin ve yukarı dönüşüm nanopartiküllerinin birlikte verilmesi için kullanılmıştır. Bu durum, akciğer kanseri hücrelerine karşı daha yüksek sitotoksiste sergilemesini ve akciğer kanseri tedavisinde sisplatinin etkinliğini ve güvenliğini arttırdığını göstermiştir (Yadav & ark., 2023). Kitosan-PLGA-FA nanotaşıyıcısı, sorafenib'i akciğer kanseri hücrelerine ulaştırmak için geliştirilmiştir. Böylece yalnızca akciğer hücrelerini hedef almakla kalmayıp aynı zamanda proliferasyonu da inhibe etmiştir (Narmani & ark., 2023). Epigallokateşin gallat yüklü PLGA nanopartikülleri, su içinde yağ emülsiyonu solvent buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ilaç yüklü nanopartiküllerin

PDX modelinde iyi bir anti-kanser aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir (Zhang & ark., 2020). CD-RES'in nano boyutlu PEG-PLGA polimerleri içinde kapsüllenmesinin akciğerlerde biriktiği, dolayısıyla KHDAK'ye karşı anti-kanser etkinliğini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir (Wang & ark., 2020). Yüzeydeki HA ve disülfit çapraz bağlı yıldız PLGA nanopartikülleri (HA-sPLGA XNP'ler), DTX'i *in vivo* ve *in vitro* olarak akciğer kanseri hücrelerine stabil bir şekilde kapsülleme ve hedefleyerek, tümör birikimini önemli ölçüde inhibe etme ve yan etkileri azaltma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Wang, Cheng & Zhong, 2021).

Redoksa duyarlı yeni PLGA, tümör mikro ortamına girerken yüzey özelliklerini değiştirmek ve böylece hücre içselleştirme yeteneğini arttırmak üzere tasarlanmıştır (Conte & ark., 2018). p28 işlevselleştirilmiş bir PLGA nanopartikülleri, tümör büyümesini azaltan ve akciğer metastazı oluşumunu zayıflatan terapötik aktivitesini uygulamak üzere gefitinib salınımını teşvik etmek için geliştirilmiştir (Garizo & ark., 2021). CD133/EGFR salinomisin sodyum PLGA hibrit nanopartikülleri, akciğer kanseri hücrelerini etkili bir şekilde hedefleyebilir ve akciğer kanseri taşıyan farelerde tümör büyümesinin inhibe edilmesinde mükemmel etkinlik gösterebilmektedir (Zhou & ark., 2018).

2.6.Lipozomlar

İlaç dağıtımı için bir taşıyıcı olarak lipozomların, akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavinin etkisini iyileştirmesi beklenmektedir. RGD ile modifiye edilmiş bir PTX ve kurkumin ortak yüklü lipozomlar geliştirilmiştir ve deneysel sonuçlar, bunların A549 hücreleri üzerinde mükemmel bir çoğalma karşıtı etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Jiang, Shen & Xu, 2018).

RPV ile modifiye edilmiş epirubisin ve diosin ile birlikte verilen lipozomlar, tümörün hedeflenmesini arttırmış ve *in vivo* olarak güçlü anti-tümör etkinliği göstermiştir (Kong & ark., 2020). Lipid kaplı prolipozom teknolojisiyle hazırlanan katyonik lipozomlar, *in vitro* apoptozu indükleyen CYP1A1 genini aşağı doğru düzenlemiş ve CYP1A1 ekspresyonunu aşağı düzenleyerek tümör büyümesini inhibe etmiştir (Zhang & ark., 2019). Anti-PD-L1 nanobody ve transferrin reseptörü, T12 peptidi ile modifiye edilmiş çift hedeflemeli lipozomlarla birleştiğinde, KHDAK tedavisinde ilaç direncinin önüne geçmiştir. Bu çift hedefli lipozom birlikte taşıma sistemi, KHDAK tedavisi için umut verici bir strateji ortaya koymuştur (Yin & ark., 2020).

Sonuç

Akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin sistematik yan etkilerinin önüne geçilmesi, sadece kanser hücrelerinin hedeflenmesi açısından immünoterapötik yaklaşımlar önemlidir. Günümüzde immünoterapötik kombinasyonlar kanserin elimine edilmesinde tedavi etkinliğinin arttırılmasını sağlamıştır. Kanser aşılarının da yeterli olmadığı durumlarda nano-taşıyıcı sistemler umut vadeci bir seçenek haline gelmiştir. Nano-taşıyıcı sistemlerin spesifikliğı ve güvenilirliğı mevcut tedavilerin daha etkili hale gelmesini sağlamıştır. Ancak kanserin tipi kullanılacak immünoterapötik ve nano-ilaç sisteminin modifiye edilmesini gerektirmektedir. Bu alanlardaki çalışmalar hızla devam etmektedir ve kanserin tedavisinde çok önemli bir yer alacağı şimdiden söylenebilir.

Referanslar

P.M. Forde, J. Spicer, S. Lu, M. Provencio, T. Mitsudomi, M.M. Awad, E. Felip, S. R. Broderick, J.R. Brahmer, S.J. Swanson, K. Kerr, C. Wang, T.E. Ciuleanu, G. B. Saylor, F. Tanaka, H. Ito, K.N. Chen, M. Liberman, E.E. Vokes, J.M. Taube, C. Dorange, J. Cai, J. Fiore, A. Jarkowski, D. Balli, M. Sausen, D. Pandya, C. Y. Calvet, N. Girard, I. (2022). CheckMate, Neoadjuvant nivolumab plus chemotherapy in resectable lung cancer, *New Engl. J. Med.* 386(21),1973–1985.

H.M. Abdelaziz, M. Gaber, M.M. Abd-Elwakil, M.T. Mabrouk, M.M. Elgohary, N. M. Kamel, D.M. Kabary, M.S. Freag, M.W. Samaha, S.M. Mortada, K. A. Elkhodairy, J.Y. Fang, A.O. Elzoghby. (2018). Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates, *J. Control Release*, 269,374–392.

N. Wathoni, L.E. Puluhulawa, I.M. Joni, M. Muchtaridi, A.F.A. Mohammed, K. M. Elamin, T. Milanda, D. Gozali. (2022). Monoclonal antibody as a targeting mediator for nanoparticle targeted delivery system for lung cancer, *Drug Deliv.*,29(1),2959–2970.

L.E. Mathieu LN, A.K. Sinha, P.S. Mishra-Kalyani, S. Jafri, S. Kalavar, S. Ghosh, K. B. Goldberg, R. Pazdur, J.A. Beaver, H. Singh. (2023). FDA approval summary: atezolizumab as adjuvant treatment following surgical resection and platinum-based chemotherapy for stage II to IIIA NSCLC, *Clin. Cancer Res*, 29(16),2973–2978.

X. Zhu, Z. Yu, L. Feng, L. Deng, Z. Fang, Z. Liu, Y. Li, X. Wu, L. Qin, R. Guo, Y. Zheng. (2021). Chitosan-based nanoparticle co-delivery of docetaxel and curcumin ameliorates anti-tumor chemoimmunotherapy in lung cancer. *Carbohydr. Polym.*, 268,118237.

C. Pi, W. Zhao, M. Zeng, J. Yuan, H. Shen, K. Li, Z. Su, Z. Liu, J. Wen, X. Song, R. J. Lee, Y. Wei, L. Zhao. (2022). Anti-lung cancer effect of paclitaxel solid lipid nanoparticles delivery system with curcumin as co-loading partner in vitro and in vivo. *Drug Deliv.*, 29(1), 1878–1891.

H. Tang, Z. Zhang, M. Zhu, Y. Xie, Z. Lv, R. Liu, Y. Shen, J. Pei. (2023). Efficient delivery of gemcitabine by estrogen receptor-targeted PEGylated liposome and its anti-lung cancer activity in vivo and in vitro. *Pharmaceutics* 15(3), 34-75.

S. Rawal, S. Khot, V. Bora, B. Patel, M.M. Patel. (2023). Surface-modified nanoparticles of docetaxel for chemotherapy of lung cancer: an intravenous to oral switch. *Int J. Pharm.*, 636,122846.

J.D. Vanza, R.B. Patel, M.R. Patel. (2020). Nanocarrier centered therapeutic approaches: recent developments with insight towards the future in the management of lung cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 60.

K. Kumar, R. Chawla. (2021). Nanocarriers-mediated therapeutics as a promising approach for treatment and diagnosis of lung cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 65.

M. Habeeb, T.A. Kareem, K.L. Deepthi, V.S. Khot, Y.H. Woon, S.S. Pawar. (2022). Nanomedicine for targeting the lung cancer cells by interpreting the signaling pathways. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 77.

R. Iyer, H. Ramachandramoorthy, T. Nguyen, C. Xu, H. Fu, T. Kotadia, B. Chen, Y. Hong, D. Saha, K.T. Nguyen. (2022). Lung cancer targeted chemoradiotherapy via dual-stimuli responsive biodegradable core-shell nanoparticles. *Pharmaceutics*, 14(8).

S. Subramaniam, P. Joyce, L. Donnellan, C. Young, A. Wignall, P. Hoffmann, C. A. Prestidge. (2023). Protein adsorption determines pulmonary cell uptake of lipid-based nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.*, 641,36–47.

Q. Feng, K. Xiao. (2022). Nanoparticle-mediated delivery of STAT3 inhibitors in the treatment of lung cancer, *Pharmaceutics* 14 (12).

Z. Schrank, G. Chhabra, L. Lin, T. Iderzorig, C. Osude, N. Khan, A. Kuckovic, S. Singh, R.J. Miller, N. Puri. (2018). Current molecular-targeted therapies in NSCLC and their mechanism of resistance, *Cancers*, 10(7).

J. Lategahn, M. Keul, D. Rauh. (2018). Lessons to be learned: the molecular basis of kinase-targeted therapies and drug resistance in non-small cell lung cancer. *Angew. Chem. Int Ed. Engl.*, 57(9),2307–2313.

E.N. Imyanitov, A.G. Iyevleva, E.V. Levchenko. (2021). Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung

cancer: Current status and perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 157,103194.

D. Romaniello, I. Marrocco, N. Belugali Nataraj, I. Ferrer, D. Drago-Garcia, I. Vaknin, R. Oren, M. Lindzen, S. Ghosh, M. Kreitman, J.C. Kittel, N. Gaborit, G. Bergado Baez, B. Sanchez, R. Eilam, E. Pikarsky, L. Paz-Ares, Y. Yarden. (2020). Targeting HER3, a catalytically defective receptor tyrosine kinase, prevents resistance of lung cancer to a third-generation EGFR kinase inhibitor. *Cancers* 12(9).

J.L. Schneider, J.J. Lin, A.T. Shaw. (2023). ALK-positive lung cancer: a moving target. *Nat, Cancer*, 4(3),330–343.

Y. Zhao, S. Guo, J. Deng, J. Shen, F. Du, X. Wu, Y. Chen, M. Li, M. Chen, X. Li, W. Li, L. Gu, Y. Sun, Q. Wen, J. Li, Z. Xiao. (2022). VEGF/VEGFR-targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: targeting the tumor microenvironment. *Int J. Biol. Sci.*, 18(9),3845–3858.

A.I. Passaro A, F. de Marinis. (2022). Neoadjuvant chemotherapy plus immunotherapy in early-stage resectable non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 40(25),2871–2877.

Y.D. Yan, Y. Zhao, C. Zhang, J. Fu, Y.J. Su, X.L. Cui, E.L. Ma, B.L. Liu, Z.C. Gu, H. W. Lin. (2022). Toxicity spectrum of immunotherapy in advanced lung cancer: a safety analysis from clinical trials and a pharmacovigilance system. *EclinicalMedicine*, 50,101535.

K. Valencia, M. Echepare, A. Teixeira, A. Pasquier, C. Bertolo, C. Sainz, I. Tamayo, B. Picabea, G. Bosco, R. Thomas, J.

Agorreta, J.M. Lopez-Picazo, J. Frigola, R. Amat, A. Calvo, E. Felip, I. Melero, L.M. Montuenga. (2022). DSTYK inhibition increases the sensitivity of lung cancer cells to T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med*, 219(12).

Y. Yu, D. Zeng, Q. Ou, S. Liu, A. Li, Y. Chen, D. Lin, Q. Gao, H. Zhou, W. Liao, H. Yao. (2019). Association of survival and immune-related biomarkers with immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis and individual patient-level analysis. *JAMA Netw. Open*, 2(7), e196879.

D. Hannani, E. Leplus, D. Laurin, B. Caulier, C. Aspod, N. Madelon, E. Bourova- Flin, C. Brambilla, E. Brambilla, A.C. Toffart, K. Laulagnier, L. Chaperot, J. Plumas. (2023). A new plasmacytoid dendritic cell-based vaccine in combination with Anti-PD-1 expands the tumor-specific CD8⁺ T cells of lung cancer patients. *Int J. Mol. Sci.* 24(3).

L.T. Oosting, K. Franke, M.V. Martin, W.P. Kloosterman, J.A. Jamieson, L. A. Glenn, M.W. de Jager, J. van Zanten, D.P. Allersma, B. Gareb. (2022). Development of a personalized tumor neoantigen based vaccine formulation (FRAME-001) for use in a phase II trial for the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Pharmaceutics*, 14(7).

W. Gu, Y. Xu, X. Chen, H. Jiang. (2022). Characteristics of clinical trials for non-small cell lung cancer therapeutic vaccines registered on ClinicalTrials. *Front Immunol.*, 13, 936667.

P.A. Ott, S. Hu-Lieskovan, B. Chmielowski, R. Govindan, A. Naing, N. Bhardwaj, K. Margolin, M.M. Awad, M.D. Hellmann, J.J. Lin, T. Friedlander, M.E. Bushway, K.N. Balogh, T.E. Sciuto,

V. Kohler, S.J. Turnbull, R. Besada, R.R. Curran, B. Trapp, J. Scherer, A. Poran, D. Harjanto, D. Barthelme, Y.S. Ting, J.Z. Dong, Y. Ware, Y. Huang, Z. Huang, A. Wanamaker, L.D. Cleary, M.A. Moles, K. Manson, J. Greshock, Z.S. Khondker, E. Fritsch, M.S. Rooney, M. DeMario, R.B. Gaynor, L. Srinivasan. (2020). A phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer. *Cell*, 183(2),347–362.

M.M. Awad, R. Govindan, K.N. Balogh, D.R. Spigel, E.B. Garon, M.E. Bushway, A. Poran, J.H. Sheen, V. Kohler, E. Esaulova, J. Srouji, S. Ramesh, R. Vyasamneni, B. Karki, T.E. Sciuto, H. Sethi, J.Z. Dong, M.A. Moles, K. Manson, M.S. Rooney, Z. S. Khondker, M. DeMario, R.B. Gaynor, L. Srinivasan. (2022). Personalized neoantigen vaccine NEO-PV-01 with chemotherapy and anti-PD-1 as first-line treatment for non-squamous non-small cell lung cancer. *Cancer Cell*, 40(9),1010–1026.

K. McCann, A. von Witzleben, J. Thomas, C. Wang, O. Wood, D. Singh, K. Boukas, K. Bendjama, N. Silvestre, F.C. Nielsen, G. Thomas, T. Sanchez-Elsner, J. Greenbaum, S. Schoenberger, B. Peters, P. Vijayanand, N. Savelyeva, C. Ottensmeier. (2022). Targeting the tumor mutanome for personalized vaccination in a TMB low non-small cell lung cancer. *J. Immunother. Cancer*, 10(3).

L. Ma, L. Diao, Z. Peng, Y. Jia, H. Xie, B. Li, J. Ma, M. Zhang, L. Cheng, D. Ding, X. Zhang, H. Chen, F. Mo, H. Jiang, G. Xu, F. Meng, Z. Zhong, M. Liu. (2021). Immunotherapy and prevention of cancer by nanovaccines loaded with whole-cell

components of tumor tissues or cells. *Adv. Mater.*, 33(43), e2104849.

J. Koh, S. Kim, S.N. Lee, S.Y. Kim, J.E. Kim, K.Y. Lee, M.S. Kim, J.Y. Heo, Y. M. Park, B.M. Ku, J.M. Sun, S.H. Lee, J.S. Ahn, K. Park, S. Yang, S.J. Ha, Y.T. Lim, M.J. Ahn. (2021). Therapeutic efficacy of cancer vaccine adjuvanted with nanoemulsion loaded with TLR7/8 agonist in lung cancer model. *Nanomedicine*, 37,102415.

M. Huang, D. Xiong, J. Pan, Q. Zhang, S. Sei, R.H. Shoemaker, R.A. Lubet, L. M. Montuenga, Y. Wang, B.S. Slusher, M. You. (2022). Targeting glutamine metabolism to enhance immunoprevention of EGFR-driven lung cancer. *Adv. Sci. (Weinh.)*, 9(26),e2105885.

G.R. Blumenschein, S. Devarakonda, M. Johnson, V. Moreno, J. Gainor, M. J. Edelman, J.V. Heymach, R. Govindan, C. Bachier, B. Doger de Speville, M. J. Frigault, A.J. Olszanski, V.K. Lam, N. Hyland, J.M. Navenot, S. Fayngerts, Z. Wolchinsky, R. Broad, D. Batrakou, M.M. Pentony, J.P. Sanderson, A. Gerry, D. Marks, J. Bai, T. Holdich, E. Norry, P.M. Fracasso. (2022). Phase I clinical trial evaluating the safety and efficacy of ADP-A2M10 SPEAR T cells in patients with MAGE-A10(+) advanced non-small cell lung cancer. *J. Immunother. Cancer*, 10(1).

Y. Jie, G. Liu, L. Feng, Y. Li, M. E, L. Wu, Y. Li, G. Rong, Y. Li, H. Wei, A. Gu. (2021). PTK7- targeting CAR T-cells for the treatment of lung cancer and other malignancies. *Front Immunol.*, 12,665970.

L. Wallstabe, C. Gottlich, L.C. Nelke, J. Kuhnemundt, T. Schwarz, T. Nerreter, H. Einsele, H. Walles, G. Dandekar, S.L. Nietzer, M. Hudecek. (2019). ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models. *JCI Insight*, 4(18).

Z. Hu, X. Zheng, D. Jiao, Y. Zhou, R. Sun, B. Wang, Z. Tian, H. Wei. (2020). LunX-CAR T cells as a targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Mol. Ther. Oncolytics*, 17,361–370.

J.E. Jaspers, J.F. Khan, W.D. Godfrey, A.V. Lopez, M. Ciampricotti, C.M. Rudin, R. J. Brentjens. (2023). IL-18-secreting CAR T cells targeting DLL3 are highly effective in small cell lung cancer models. *J. Clin. Invest*, 133(9).

B. Cao, M. Liu, L. Wang, K. Zhu, M. Cai, X. Chen, Y. Feng, S. Yang, S. Fu, C. Zhi, X. Ye, J. Zhang, Z. Zhang, X. Yang, M. Zhao, Q. Wu, L. Xu, L. Yang, H. Lian, Q. Zhao, Z. Zhang. (2022). Remodelling of tumour microenvironment by microwave ablation potentiates immunotherapy of AXL-specific CAR T cells against non-small cell lung cancer. *Nat. Commun.*, 13(1).

L. Zhu, J. Liu, G. Zhou, T.M. Liu, Y. Dai, G. Nie, Q. Zhao. (2021). Remodeling of tumor microenvironment by tumor-targeting nanozymes enhances immune activation of CAR T cells for combination therapy. *Small*, 17(43), e2102624.

P. Shah, M.A. Forget, M.L. Frank, P. Jiang, D. Sakellariou-Thompson, L. Federico, R. Khairullah, C.A. Neutzler, I. Wistuba, C.B. Chow, Y. Long, J. Fujimoto, S.Y. Lin, A. Maitra, M.V. Negrao, K.G. Mitchell, A. Weissferdt, A.A. Vaporciyan, T. Cascone, J.A. Roth, J. Zhang, B. Sepesi, D.L. Gibbons, J.V. Heymach, C. L.

Haymaker, D.J. McGrail, A. Reuben, C. Bernatchez. (2022). Combined IL-2, agonistic CD3 and 4-1BB stimulation preserve clonotype hierarchy in propagated non-small cell lung cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunother. Cancer*, 10(2).

J.J. Lipp, L. Wang, H. Yang, F. Yao, N. Harrer, S. Muller, S. Berezowska, P. Dorn, T.M. Marti, R.A. Schmid, B. Hegedus, A. Souabni, S. Carotta, M.A. Pearson, W. Sommergruber, G.J. Kocher, S.R.R. Hall. (2022). Functional and molecular characterization of PD1(+) tumor-infiltrating lymphocytes from lung cancer patients. *Oncoimmunology*, 11(1),2019466.

H.K.Lin CY, S.H. Kao, M.S. Lin, C.C. Lin, S.C. Yang, W.C. Chung, Y.H. Chang, R. J. Chein, P.C. Yang. (2023). Small-molecule PIK-93 modulates the tumor microenvironment to improve immune checkpoint blockade response. *Sci. Adv.*, 9(14).

B.C. Creelan, C. Wang, J.K. Teer, E.M. Toloza, J. Yao, S. Kim, A.M. Landin, J. E. Mullinax, J.J. Saller, A.N. Saltos, D.R. Noyes, L.B. Montoya, W. Curry, S. A. Pilon-Thomas, A.A. Chiappori, T. Tanvetyanon, F.J. Kaye, Z.J. Thompson, S. J. Yoder, B. Fang, J.M. Koomen, A.A. Sarnaik, D.T. Chen, J.R. Conejo-Garcia, E. B. Haura, S.J. Antonia. (2021). Tumor-infiltrating lymphocyte treatment for anti-PD-1- resistant metastatic lung cancer: a phase 1 trial. *Nat. Med*, 27(8) 1410–1418.

A. Lahiri, A. Maji, P.D. Potdar, N. Singh, P. Parikh, B. Bisht, A. Mukherjee, M. K. Paul. (2023). Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Mol. Cancer*, 22(1),40-56.

M. Sun, S. Yang, H. Huang, P. Gao, S. Pan, Z. Cheng, Z. He, Z. Wang, J. Sun, F. Liu. (2022). Boarding oncolytic viruses onto

tumor-homing bacterium-vessels for augmented cancer immunotherapy. *Nano Lett*, 22(12),5055–5064.

N. Varudkar, J.L. Oyer, A. Copik, G.D. (2021). Parks, Oncolytic parainfluenza virus combines with NK cells to mediate killing of infected and non-infected lung cancer cells within 3D spheroids: role of type I and type III interferon signaling. *J. Immunother. Cancer* 9(6).

D. Masemann, R. Meissner, T. Schied, B.D. Lichty, U.R. Rapp, V. Wixler, S. Ludwig. (2021). Synergistic anti-tumor efficacy of oncolytic influenza viruses and B7- H3 immune- checkpoint inhibitors against IC-resistant lung cancers. *Oncoimmunology* 10(1),1885778.

D. Chen, L. Huang, H. Zhou, Y. Zhang. (2021). Combining IL-10 and oncolytic adenovirus demonstrates enhanced antitumor efficacy through CD8(+) T cells. *Front Immunol.*, 12,615089.

M. Garofalo, H. Saari, P. Somersalo, D. Crescenti, L. Kuryk, L. Aksela, C. Capasso, M. Madetoja, K. Koskinen, T. Oksanen, A. Makitie, M. Jalasvuori, V. Cerullo, P. Ciana, M. Yliperttula. (2018). Antitumor effect of oncolytic virus and paclitaxel encapsulated in extracellular vesicles for lung cancer treatment. *J. Control Release*, 283,223–234.

P. Kellish, D. Shabashvili, M.M. Rahman, A. Nawab, M.V. Guijarro, M. Zhang, C. Cao, N. Moussatche, T. Boyle, S. Antonia, M. Reinhard, C. Hartzell, M. Jantz, H. J. Mehta, G. McFadden, F.J. Kaye, M. Zajac-Kaye. (2019). Oncolytic virotherapy for small-cell lung cancer induces immune infiltration and prolongs survival. *J. Clin. Invest*, 129(6),2279–2292.

S. Wang, Y. Li, Z. Liu, W. Tian, Y. Zeng, J. Liu, S. Zhang, Y. Peng, F. Wu. (2023). Efficacy and safety of first-line immune checkpoint inhibitors combined with chemotherapy for extensive-stage small cell lung cancer: a network meta-analysis. *Lung Cancer*, 178,47–56.

H. Yang, B. Sun, W. Ma, L. Fan, K. Xu, Y. Jia, J. Xu, Z. Wang, F. Yao. (2022). Multi-scale characterization of tumor-draining lymph nodes in resectable lung cancer treated with neoadjuvant immune checkpoint inhibitors. *EbioMedicine*, 84,104265.

W. Mao, Y. Cai, D. Chen, G. Jiang, Y. Xu, R. Chen, F. Wang, X. Wang, M. Zheng, X. Zhao, J. Mei. (2022). Statin shapes inflamed tumor microenvironment and enhances immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *JCI Insight*, 7(18).

B. Tang, Y. Wang, W. Xu, J. Zhu, Q. Weng, W. Chen, S. Fang, Y. Yang, R. Qiu, M. Chen, W. Mao, M. Xu, Z. Zhao, S. Cai, H. Zhang, J. Ji. (2023). Macrophage xCT deficiency drives immune activation and boosts responses to immune checkpoint blockade in lung cancer. *Cancer Lett.*, 554,216021.

H. Madhi, J.S. Lee, Y.E. Choi, Y. Li, M.H. Kim, Y. Choi, S.H. Goh. (2022). FOXM1 inhibition enhances the therapeutic outcome of lung cancer immunotherapy by modulating PD-L1 expression and cell proliferation. *Adv. Sci. (Weinh.)*, 9(29),e2202702.

B.C. Tiu, L. Zubiri, J. Iheke, V. Pahalyants, N. Theodosakis, P. Ugwu-Dike, J. Seo, K. Tang, M.E. Sise, R. Sullivan, J. Naidoo, M.J. Mooradian, Y.R. Semenov, K. L. Reynolds. (2022). Real-world

incidence and impact of pneumonitis in patients with lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a multi-institutional cohort study. *J. Immunother. Cancer*, 10(6).

M. Zhang, Y. Fan, L. Nie, G. Wang, K. Sun, Y. Cheng, Clinical outcomes of immune checkpoint inhibitor therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer and preexisting interstitial lung diseases: a systematic review and meta-analysis, *Chest* 161 (6) (2022) 1675–1686.

F. Mottaghitlab, M. Farokhi, Y. Fatahi, F. Atyabi, R. Dinarvand, New insights into designing hybrid nanoparticles for lung cancer: diagnosis and treatment, *J. Control Release* 295 (2019) 250–267.

A.G. Alvanegh, S.M. Ganji, A. Kamel, M. Tavallaie, A. Rafati, A. Arpanaei, R. Dorostkar, H.E.G. Ghaleh, Comparison of oncolytic virotherapy and nanotherapy as two new miRNA delivery approaches in lung cancer, *Biomed. Pharm.* 140 (2021), 111755.

W. Xiao, W. Ma, S. Wei, Q. Li, R. Liu, R.P. Carney, K. Yang, J. Lee, A. Nyugen, K. Y. Yoneda, K.S. Lam, T. Li. (2019). High-affinity peptide ligand LXY30 for targeting alpha3beta1 integrin in non-small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.*, 12(1),56.

K. Jeong, Y.J. Yu, J.Y. You, W.J. (2020). Rhee, J.A. Kim, Exosome-mediated microRNA- 497 delivery for anti-cancer therapy in a microfluidic 3D lung cancer model. *Lab Chip*, 20(3),548–557.

M.Y. Li, L.Z. Liu, M. (2021). Dong, Progress on pivotal role and application of exosome in lung cancer carcinogenesis, diagnosis, therapy and prognosis. *Mol. Cancer*, 20(1), 22.

Y. Wang, M. Guo, D. Lin, D. Liang, L. Zhao, R. Zhao, Y. Wang. (2021). Docetaxel-loaded exosomes for targeting non-small cell lung cancer: preparation and evaluation in vitro and in vivo. *Drug Deliv.*, 28(1),1510–1523.

B. Liu, Z. Li, S. Huang, B. Yan, S. He, F. Chen, Y. Liang. (2021). AAV-containing exosomes as a novel vector for improved gene delivery to lung cancer cells. *Front Cell Dev. Biol.*, 9,707607.

R. Kandimalla, F. Aqil, S.S. Alhakeem, J. Jeyabalan, N. Tyagi, A. Agrawal, J. Yan, W. Spencer, S. Bondada, R.C. Gupta. (2021). Targeted oral delivery of paclitaxel using colostrum-derived exosomes. *Cancers*, 13(15).

Y. Lin, S. Li, Z. Xiao, S. Chen, L. Yang, Q. Peng, H. Li, J. Fu, X. Yu, L. Zhang. (2021). Epigenetic inhibition assisted chemotherapeutic treatment of lung cancer based on artificial exosomes. *Pharm. Res*, 171, 105787.

H. Wu, X. Mu, L. Liu, H. Wu, X. Hu, L. Chen, J. Liu, Y. Mu, F. Yuan, W. Liu, Y. Zhao. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA- 193a reduces cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells via targeting LRRC1. *Cell Death Dis*, 11 (9),801.

H. Nie, X. Xie, D. Zhang, Y. Zhou, B. Li, F. Li, F. Li, Y. Cheng, H. Mei, H. Meng, L. Jia. (2020). Use of lung-specific exosomes for miRNA-126 delivery in non-small cell lung cancer. *Nanoscale*, 12(2),877–887.

S. Liu, W. Wang, Y. Ning, H. Zheng, Y. Zhan, H. Wang, Y. Yang, J. Luo, Q. Wen, H. Zang, J. Peng, J. Ma, S. Fan. (2022).

Exosome-mediated miR-7-5p delivery enhances the anticancer effect of Everolimus via blocking MNK/eIF4E axis in non-small cell lung cancer. *Cell Death Dis*, 13(2),129-142.

Y. Yan, C. Du, X. Duan, X. Yao, J. Wan, Z. Jiang, Z. Qin, W. Li, L. Pan, Z. Gu, F. Wang, M. Wang, Z. Qin. (2022). Inhibiting collagen I production and tumor cell colonization in the lung via miR-29a-3p loading of exosome-/liposome-based nanovesicles. *Acta Pharm. Sin. B*, 12(2),939–951.

Z.C. Soe, B.K. Poudel, H.T. Nguyen, R.K. Thapa, W. Ou, M. Gautam, K. Poudel, S. G. Jin, J.H. Jeong, S.K. Ku, H.G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim. (2019). Folate-targeted nanostructured chitosan/chondroitin sulfate complex carriers for enhanced delivery of bortezomib to colorectal cancer cells. *Asian J. Pharm. Sci.*, 14(1),40–51.

V. Patel, R. Lalani, I. Vhora, D. Bardoliwala, A. Patel, S. Ghosh, A. Misra. (2021). Co-delivery of cisplatin and siRNA through hybrid nanocarrier platform for masking resistance to chemotherapy in lung cancer. *Drug Deliv. Transl. Res*, 11(5),2052–2071.

T. Zhong, X. Liu, H. Li, J. Zhang. (2021). Co-delivery of sorafenib and crizotinib encapsulated with polymeric nanoparticles for the treatment of in vivo lung cancer animal model. *Drug Deliv.*, 28(1),2108–2118.

S. Wang, J. Gou, Y. Wang, X. Tan, L. Zhao, X. Jin, X. Tang. (2021). Synergistic antitumor efficacy mediated by liposomal co-delivery of polymeric micelles of vinorelbine and cisplatin in non-small cell lung cancer. *Int. J. Nanomed.*, 16,2357–2372.

J. Pang, H. Xing, Y. Sun, S. Feng, S. (2020). Wang, Non-small cell lung cancer combination therapy: hyaluronic acid modified, epidermal growth factor receptor targeted, pH sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib plus bevacizumab. *Biomed. Pharm.*, 125,109861.

G. Chen, Y. Zhang, H. Deng, Z. Tang, J. Mao, L. Wang. (2020). Pursuing for the better lung cancer therapy effect: Comparison of two different kinds of hyaluronic acid and nitroimidazole co-decorated nanomedicines. *Biomed. Pharm.*, 125,109988.

G. Wang, Z. Wang, C. Li, G. Duan, K. Wang, Q. Li, T. Tao. (2018). RGD peptide-modified, paclitaxel prodrug-based, dual-drugs loaded, and redox-sensitive lipid-polymer nanoparticles for the enhanced lung cancer therapy. *Biomed. Pharm.*, 106,275–284.

Z. Zhou. (2020). Co-drug delivery of regorafenib and cisplatin with amphiphilic copolymer nanoparticles: enhanced in vivo antitumor cancer therapy in nursing care. *Drug Deliv.*, 27(1),1319–1328.

Y. Zou, Y. Sun, B. Guo, Y. Wei, Y. Xia, Z. Huangfu, F. Meng, J.C.M. van Hest, J. Yuan, Z. Zhong. (2020). Alpha(3)beta(1) integrin-targeting polymersomal docetaxel as an advanced nanotherapeutic for nonsmall cell lung cancer treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12(13),14905–14913.

R. Iyer, T. Nguyen, D. Padanilam, C. Xu, D. Saha, K.T. Nguyen, Y. Hong. (2020). Glutathione-responsive biodegradable polyurethane nanoparticles for lung cancer treatment. *J. Control Release*, 321,363–371.

W. Li, H. Yu, D. Ding, Z. Chen, Y. Wang, S. Wang, X. Li, M. Keidar, W. Zhang. (2019). Cold atmospheric plasma and iron oxide-based magnetic nanoparticles for synergetic lung cancer therapy. *Free Radic. Biol. Med.*, 130,71–81.

X. Huang, Y. Yuan, W. Ruan, L. Liu, M. Liu, S. Chen, X. Zhou. (2018). pH-responsive theranostic nanocomposites as synergistically enhancing positive and negative magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Nanobiotechnol.*, 16(1),30-45.

P. Gao, C. Mei, L. He, Z. Xiao, L. Chan, D. Zhang, C. Shi, T. Chen, L. Luo. (2018). Designing multifunctional cancer-targeted nanosystem for magnetic resonance molecular imaging-guided theranostics of lung cancer. *Drug Deliv.*, 25(1),1811–1825.

P. Kulkarni, M. Rajadurai, A. Sevilimedu, S. Basaveni, S. Yellanki, R. Medishetti, U. Saxena. (2018). Magnetic nanoparticle formulation for targeted delivery of chemotherapeutic irinotecan to lungs. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 8(5),1450–1459.

C.M. Zimmermann, D. Baldassi, K. Chan, N.B.P. Adams, A. Neumann, D.L. Porras- Gonzalez, X. Wei, N. Kneidinger, M.G. Stoleriu, G. Burgstaller, D. Witzigmann, P. Luciani, O.M. Merkel. (2022). Spray drying siRNA-lipid nanoparticles for dry powder pulmonary delivery. *J. Control Release*, 351,137–150.

D. Di Paolo, F. Pontis, M. Moro, G. Centonze, G. Bertolini, M. Milione, M. Mensah, M. Segale, I. Petraroia, C. Borzi, P. Suatoni, C. Brignole, P. Perri, M. Ponzoni, U. Pastorino, G. Sozzi, O. Fortunato. (2021). Cotargeting of miR-126-3p and miR-221-3p inhibits PIK3R2 and PTEN, reducing lung cancer growth and

metastasis by blocking AKT and CXCR4 signalling. *Mol. Oncol.*, 15(11),2969–2988.

M. Moro, D. Di Paolo, M. Milione, G. Centonze, V. Bornaghi, C. Borzi, P. Gandellini, P. Perri, U. Pastorino, M. Ponzoni, G. Sozzi, O. Fortunato. (2019). Coated cationic lipid-nanoparticles entrapping miR-660 inhibit tumor growth in patient-derived xenografts lung cancer models. *J. Control Release*, 308,44–56.

S.J. Nadaf, S.G. Killedar, V.M. Kumbar, D.A. Bhagwat, S.S. Gurav. (2022). Pazopanib-laden lipid based nanovesicular delivery with augmented oral bioavailability and therapeutic efficacy against non-small cell lung cancer. *Int J. Pharm.*, 628,122287.

H. Khatri, N. Chokshi, S. Rawal, B.M. Patel, M. Badanthadka, M.M. Patel. (2020). Fabrication and in vivo evaluation of ligand appended paclitaxel and artemether loaded lipid nanoparticulate systems for the treatment of NSCLC: a nanoparticle assisted combination oncotherapy. *Int J. Pharm.*, 583,119386.

A.Y. Sherif, G.I. Harisa, F.K. Alanazi, F.A. Nasr, A.S. Alqahtani. (2022). PEGylated SLN as a promising approach for lymphatic delivery of gefitinib to lung cancer. *Int J. Nanomed.*, 17,3287–3311.

J. Majumder, T. Minko. (2021). Multifunctional lipid-based nanoparticles for codelivery of anticancer drugs and siRNA for treatment of non-small cell lung cancer with different level of resistance and EGFR mutations. *Pharmaceutics*, 13(7).

B. Yadav, M. Chauhan, S. Shekhar, A. Kumar, A.K. Mehata, A.K. Nayak, R. Dutt, V. Garg, V. Kailashiya, M.S. Muthu, Sonali, R.P. Singh. (2023). RGD-decorated PLGA nanoparticles improved effectiveness and safety of cisplatin for lung cancer therapy. *Int. J. Pharm.* 633.

A. Narmani, S. Ganji, M. Amirishoar, R. Jahedi, M.S. Kharazmi, S.M. Jafari, (2023). Smart chitosan-PLGA nanocarriers functionalized with surface folic acid ligands against lung cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 245.

L. Zhang, W. Chen, G. Tu, X. Chen, Y. Lu, L. Wu, D. Zheng. (2020). Enhanced chemotherapeutic efficacy of PLGA-encapsulated epigallocatechin gallate (EGCG) against human lung cancer. *Int J. Nanomed.*, 15,4417–4429.

X. Wang, V. Parvathaneni, S.K. Shukla, N.S. Kulkarni, A. Muth, N.K. Kunda, V. Gupta. (2020). Inhalable resveratrol-cyclodextrin complex loaded biodegradable nanoparticles for enhanced efficacy against non-small cell lung cancer. *Int J. Biol. Macromol.*, 164,638–650.

X. Wang, R. Cheng, Z. Zhong. (2021). Facile fabrication of robust, hyaluronic acid-surfaced and disulfide-crosslinked PLGA nanoparticles for tumor-targeted and reduction-triggered release of docetaxel. *Acta Biomater*, 125,280–289.

C. Conte, F. Mastrotto, V. Taresco, A. Tchoryk, F. Quaglia, S. Stolnik, C. Alexander. (2018). Enhanced uptake in 2D- and 3D-lung cancer cell models of redox responsive PEGylated nanoparticles with sensitivity to reducing extra- and intracellular environments. *J. Control Release*, 277,126–141.

A.R. Garizo, F. Castro, C. Martins, A. Almeida, T.P. Dias, F. Fernandes, C. C. Barrias, N. Bernardes, A.M. Fialho, B. Sarmento. (2021). p28-functionalized PLGA nanoparticles loaded with gefitinib reduce tumor burden and metastases formation on lung cancer. *J. Control Release*, 337,329–342.

J. Zhou, J. Sun, H. Chen, Q. Peng. (2018). Promoted delivery of salinomycin sodium to lung cancer cells by dual targeting PLGA hybrid nanoparticles. *Int J. Oncol.* 53(3),1289–1300.

K. Jiang, M. Shen, W. Xu. (2018). Arginine, glycine, aspartic acid peptide-modified paclitaxel and curcumin co-loaded liposome for the treatment of lung cancer: in vitro/vivo evaluation. *Int J. Nanomed.* 13, 2561–2569.

L. Kong, F.Y. Cai, X.M. Yao, M. Jing, M. Fu, J.J. Liu, S.Y. He, L. Zhang, X.Z. Liu, R. J. Ju, X.T. Li. (2020). RPV-modified epirubicin and dioscin co-delivery liposomes suppress non-small cell lung cancer growth by limiting nutrition supply. *Cancer Sci.*, 111(2),621–636.

M. Zhang, Q. Wang, K.W. Wan, W. Ahmed, D.A. Phoenix, Z. Zhang, M.A. Elrayess, A. Elhissi, X. Sun. (2019). Liposome mediated-CYP1A1 gene silencing nanomedicine prepared using lipid film-coated proliposomes as a potential treatment strategy of lung cancer. *Int J. Pharm.*, 566,185–193.

W. Yin, Y. Zhao, X. Kang, P. Zhao, X. Fu, X. Mo, Y. Wang, Y. Huang. (2020). BBB-penetrating codelivery liposomes treat brain metastasis of non-small cell lung cancer with EGFR(T790M) mutation. *Theranostics*, 10(14),6122–6135.

