

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

USNİK ASİT LİKEN SEKONDER METABOLİTİNİN FARKLI KANSER HÜCRE
TİPLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Adnan Berk Dinçsoy

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Demet Cansaran Duman

Şubat

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Adnan Berk Dinçsoy

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN danışmanlığında Adnan Berk DİNÇSOY tarafından hazırlanan bu çalışma 15/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Yrd. Doç. Dr. Kürşat DERİCİ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Usnik Asit Liken Sekonder Metabolitinin Farklı Kanser Hücre Tipleri Üzerine Etkisinin
Araştırılması

Adnan Berk Dinçsoy

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Demet Cansaran Duman

Kanser günümüzde önemli bir sağlık problemidir ve kanser tedavisinde kullanılan çoğu kanser ilaçlarının istenmeyen yan etkilerinin bulunması alternatif tedavi yöntemlerinin arayışını hızlandırmıştır. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerine karşı sentetik, bitkisel ve fungus kaynaklı ilaçların antikarsinojenik etkileri araştırılmaktadır. Likenler fungus ve alglerin oluşturduğu simbiyotik organizmalardır ve sentezledikleri metabolitler birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda likenler ve sekonder metabolitlerinin de kanser tedavisinde çözüm olabilmesi için alternatif bir biyolojik organizma olarak kullanılması önerilmektedir.

Çalışmamızda usnik asit'in antikanser etki potansiyeli normal hücre hatları (L929 ve Vero) ve farklı kanser hücre hatları (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD and Wehi) üzerinde araştırılmıştır. Hücrelere usnik asit'in 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μ M konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Pozitif kontrol gruplarına yalnızca amonyum molibdat, negatif kontrol gruplarına ise usnik asit çözücüsü olarak kullanılan Dimetil sülfoksit (DMSO) uygulanmıştır. Usnik asit'in hücre canlılığına olan etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca usnik asit'in inhibisyon etkisinin apoptotik yolak ile ilişkili olabileceğinden dolayı mRNA ekspresyon profilleri de araştırılmıştır. Bu çalışma, liken sekonder metaboliti olan usnik asit'in kanserli ve normal hücrelere olan hücre canlılığı üzerine etkisinin mRNA boyutunda qRT-PCR ile açıklamayı hedefleyen ilk çalışmadır. Usnik asit'in TP53, Bcl-2 ve BAX tümör supresor genleri üzerine olan ekspresyon ifade değişiklikleri qRT-PCR ile değerlendirilmiştir. Çalışmamız sonucunda usnik asit'in 6.25 ve 12.5 μ M konsantrasyonları kanserli hücre hatları üzerine önemli sitotoksik etki göstermektedir. Usnik asit kanser hücrelerindeki apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Elde edilen bulgular ile liken metaboliti olan usnik asit'in rutin kanser kemoterapisine dirençli hastalarda kanser tedavisine yanıt geliştirmek için destekleyici etki sağladığı ön görülmektedir. Liken türlerinin ve bunların sekonder metabolitlerinin antikanser aktivitesine bağlı olan moleküler mekanizmaları aydınlatıcı ileri çalışmalar gereklidir.

2016, 103 sayfa

Anahtar kelimeler: Usnik asit, kanser, MTT, apoptoz, qRT-PCR.

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

Investigation Of The Impact On Different Types Of Cancer Cell Of Lichen Secondary
Compound Usnic Acid

Adnan Berk Dinçsoy

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Demet Cansaran Duman

Nowadays cancer is an important public health problem and presence of undesirable side effects of cancer drugs that is often used in the treatment of cancer has stimulated the search for alternative therapeutic approaches. Therefore anticarcinogenic effects of synthetic, herbal and fungal origin drugs have been investigated against various types of cancer in recent studies. Lichens, symbiotic organisms consisting of fungi and algae and synthesize metabolites with many biological activities. As a result of research, lichens and their secondary metabolites to be used as an alternative biological organisms is suggested to be a solution for treating cancer.

In the current study, screening of the anticancer effect potential of usnic acid (UA) on various types of normal (L929 and Vero) and different cancer cell line (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD and Wehi) were investigated. The cells were treated for 24, 48 and 72h by UA at final concentration 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400uM. Positive control groups were the ones treated with ammonium molybdate solely and negative control groups were the ones treated with a DMSO as usnic acid solvent. The growth inhibitory effect of UA were determined by MTT assay. Furthermore, this study was to explore mRNA expression profiles because inhibition of UA might be related to apoptotic pathway. This is the first study that explains antiproliferative effects of lichen secondary metabolites of usnic acid on cancer and normal cells at a level of mRNA by qRT-PCR. The effect of UA on the gene expression pattern of the tumor suppressor gene TP53, Bcl and BAX- 2 were studied with qRT-PCR. Our results revealed that, 6.25 and 12.5 uM doses of UA have significant cytotoxic effect on examined cancer cell lines. Our present results suggest that usnic acid plays a major role in the regulation of apoptosis in cancer cells. The obtained finding is foreseen that lichen metabolites as UA improves cancer response to cancer treatment in patients resistant to routine chemotherapy provides supportive effect. Further study is required to enlighten additional molecular mechanisms depend on the anti-cancer activity of the lichen species and their secondary metabolites.

2016, 103 sayfa

Key words: Usnic acid, cancer, MTT, apoptosis, qRT-PCR.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca desteğini her zaman hissettiğim, bundan sonraki çalışmalarım boyunca da bilgi, destek ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım, sabrı ve bana olan güveni için değerli danışman hocam Doç. Dr. Demet Cansaran Duman'a,

Tez çalışmasını gerçekleştirmemde yardımcı olan desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. E. Sümer Aras'a,

Bu tez çalışması boyunca elinden gelen tüm desteği sağlayan, her zaman yanımda olan değerli hocam Öğr. Gör. Dr. İlker Büyük'e,

Tez çalışmama desteklerinden dolayı değerli hocam Dr. Semra Soydam-Aydın'a, Yrd.Doç.Dr. Kürşat Derici, Blm.Uzm. Hakan Büzkaya'ya ve Türk İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'na

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Nil Kılıç'a

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine,

Desteğini esirgemeyip her zaman yanımda olan Yasemin Kartal'a

Hayatım boyunca hep yanımda olup beni her konuda destekleyen CANIM AİLEME,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Adnan Berk DİNÇSOY

Şubat, 2016

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. KANSER	3
2.1.1. KANSER HASTALIĞI GÖRÜLME SIKLIĞI.....	4
2.1.2. KANSER TEDAVİ YÖNTEMLERİ.....	5
2.2. APOPTOZİS	7
2.3. TEDAVİ AMAÇLI KULLANILABİLEN BİYOLOJİK ORGANİZMA: LİKENLER	9
2.3.1. LİKEN PRİMER METABOLİTLERİ.....	10
2.3.2. LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİ.....	10
2.3.3. USNİK ASİT.....	12
3. GEREKÇE VE AMAC	14
4. MATERYAL VE YÖNTEM	15

4.1. MATERYAL	15
4.1.1. GENEL REAKTİFLER.....	15
4.1.2. LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİ.....	15
4.1.3. KANSER VE NORMAL HÜCRE HATLARI.....	15
4.1.4. KULLANILAN ÇÖZELTİLER	16
4.1.5. KULLANILAN CİHAZLAR	17
4.2. YÖNTEM.....	18
4.2.1. LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİNİN ÇÖZÜLMESİ VE UYGUN KONSANTRASYONLARIN HAZIRLANMASI.....	18
4.2.2. DOĞAL USNİK ASİT'İN İZOLASYONU VE HPLC YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI.....	19
4.2.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE İDAMESİ.....	20
4.2.4. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN HÜCRE SAYISININ OPTİMİZE EDİLMESİ VE PLATE YERLEŞİMİ.....	21
4.2.5. HÜCRE SAYIMI.....	22
4.2.6. LİKEN SEKONDER METABOLİTİNİN FARKLI TİPTEKİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MTT TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	22
4.2.7. EC50 DEĞERİNİN BELİRLENMESİ VE USNİK ASİT KONSANTRASYONLARININ UYGULANMASI	24
4.2.8. TOTAL RNA İZOLASYONU, MİKTAR VE KALİTE TAYİNİ.....	25
4.2.9. cDNA (KOMPLEMENTER DNA) SENTEZİ.....	25
4.2.10. PRİMER DİZAYNI	27
4.2.11. GEN İFADESİNİN REAL-TİME PCR İLE BELİRLENMESİ.....	28
4.2.12. NORMALİZASYON VE İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR	30
4.2.13. VERİ ANALİZİ.....	31
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>32</u>

5.1. DOĞAL USNİK ASİT'İN İZOLASYONU VE HPLC YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI	32
5.2. DOĞAL VE TİCARİ USNİK ASİT'İN MTT TESTİ SONUÇLARI.....	33
5.3. DOĞAL USNİK ASİT UYGULAMASI SONUCU MTT HÜCRE CANLILIĞI YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ.....	33
5.4. TİCARİ USNİK ASİT UYGULAMASINA AİT SONUÇLAR	47
5.5. MTT TESTİ SONUCUNDA UYGUN USNİK ASİT (EC50) DEĞERİNİ BELİRLEME	61
5.6. QRT-PCR VE TOTAL RNA İZOLASYONU	62
5.6.1. TOTAL RNA İZOLASYON SONUÇLARI	63
5.6.2. CDNA SENTEZİ SONUÇLARI	64
5.6.3. QRT-PCR SONUÇLARI.....	65
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>73</u>
6.1. TARTIŞMA	73
6.1.1. USNİK ASİT'İN FARKLI HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	73
6.1.2. USNİK ASİT UYGULAMASI SONRASI ÇALIŞILAN HÜCRE HATLARI ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİNİN QRT-PCR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ	77
6.2. SONUÇ.....	79
<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>81</u>
<u>8. EKLER.....</u>	<u>93</u>
<u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>101</u>
<u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>102</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Usnik asit formülasyonu (5).....	1
Şekil 2.1. Kanser gelişim süreci (31).....	3
Şekil 2.2. Apoptotik yolak (77).....	9
Şekil 2.3. Liken maddeleri biyosentez yolları.....	11
Şekil 2.4. Liken sekonder metabolitlerinin olası antikanser mekanizmasının şematik gösterimi (kesin çizgi olanlar araştırılanlar, kesikli çizgi olanlar hala üzerine çalışılmamış olan mekanizmalar) (102).....	12
Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması ve deney tasarımı.....	18
Şekil 4.2. Usnik asit.....	19
Şekil 4.3. Usnik asit'in kalibrasyon eğrisi.....	20
Şekil 4.4. Thoma Lamı ve Thoma lamının sayım yapılan kareleri.....	22
Şekil 4.5. MTT testi (Hep2C-48 saat, NK: Negatif Kontrol, UA: Usnik Asit).....	24
Şekil 4.6. EC50 konsantrasyonuna göre Usnik Asit Uygulaması.....	25
Şekil 5.1. Usnea diffracta liken türünden izole edilen usnik asit'in HPLC ile analizi. (A) solvent (tR: 5.4 dk); (B) usnik asit (tR: 13.1 dk).....	32
Şekil 5.2. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş CaCo2 hücreleri.....	34
Şekil 5.3. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş CaCo2 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri.....	35
Şekil 5.4. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş HepG2 hücreleri.....	36

Şekil 5.5. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş HepG2 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri	37
Şekil 5.6. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş Hep2C hücreleri.....	38
Şekil 5.7. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş Hep2C hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri	39
Şekil 5.8. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş RD hücreleri.....	40
Şekil 5.9. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş RD hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri.....	41
Şekil 5.10. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş Wehi hücreleri.....	42
Şekil 5.11. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş Wehi hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri.....	43
Şekil 5.12. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş L929 hücreleri.....	44
Şekil 5.13. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş L929 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri.....	45
Şekil 5.14. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş Vero hücreleri.....	46
Şekil 5.15. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş Vero hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri.....	47
Şekil 5.16. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş CaCo2 hücreleri.....	48

Şekil 5.17. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş CaCo2 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi.....	49
Şekil 5.18. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş HepG2 hücreleri.....	50
Şekil 5.19. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş HepG2 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi.....	51
Şekil 5.20. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş Hep2C hücreleri.....	52
Şekil 5.21. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş Hep2C hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi.....	53
Şekil 5.22. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş RD hücreleri.....	54
Şekil 5.23. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş RD hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi.....	55
Şekil 5.24. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş Wehi hücreleri.....	56
Şekil 5.25. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş Wehi hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi.....	57
Şekil 5.26. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş L929 hücreleri.....	58
Şekil 5.27. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş L929 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi.....	59
Şekil 5.28. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş Vero hücreleri.....	60

Şekil 5.29. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş Vero hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi.....	61
Şekil 5.30. Usnik asit uygulaması sonrasında izole edilen RNA örneklerinin %1,2'lik agaroz jel görüntüsü (1: Hep2C, 2: RD, 3: Wehi, 4: L929, 5: Vero).....	63
Şekil 5.31. Çalışılan örneklerde TP53 geninin erime eğrisi analizi	65
Şekil 5.32. Çalışılan örneklerde Bcl-2 geninin erime eğrisi analizi	66
Şekil 5.33. Çalışılan örneklerde Bax geninin erime eğrisi analizi	66
Şekil 5.34. Çalışılan örneklerde GAPDH geninin erime eğrisi analizi	67
Şekil 5.35. Çalışılan örneklerde TP53 geninin Real Time PCR pik profilleri	67
Şekil 5.36. Çalışılan örneklerde Bcl-2 geninin Real Time PCR pik profilleri	68
Şekil 5.37. Çalışılan örneklerde Bax geninin Real Time PCR pik profilleri.....	68
Şekil 5.38. Çalışılan örneklerde GAPDH geninin Real Time PCR pik profilleri	69
Şekil 5.39. Hep2C hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri	69
Şekil 5.40. RD hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri....	70
Şekil 5.41. Wehi hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri.	70
Şekil 5.42. L929 hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri.	71
Şekil 5.43. Vero hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri .	71
Şekil 8.1. Hep2C hücre hattı (6.25 µM Usnik asit uygulaması 24 saat sonrası).	93
Şekil 8.2. Hep2C hücre hattı (12.25 µM Usnik asit uygulaması 48 saat sonrası).	93
Şekil 8.3. Hep2C hücre hattı (50 µM Usnik asit uygulaması 72 saat sonrası).	93
Şekil 8.4. Hep2C hücre hattı negatif kontrol (48 saat).	94

Şekil 8.5. L929 hücre hattı (400 µM Usnik asit uygulaması 48 saat sonrası).....	94
Şekil 8.6. L929 hücre hattı (DMSO kontrol-48 saat).	94
Şekil 8.7. Caco hücre hattına 6.25 µM UA uygulanması (24 saat sonra).	95
Şekil 8.8. CaCo hücre hattına 100 µM UA uygulanması (24 saat sonra).	95
Şekil 8.9. Wehi hücre hattına 50 µM UA uygulanması (24 saat sonra).....	95
Şekil 8.10. Wehi hücre hattına 200 µM UA uygulanması (48 saat sonra).....	96
Şekil 8.11. Wehi hücre hattı pozitif kontrol (48 saat sonra).....	96
Şekil 8.12. Wehi hücre hattı negatif kontrol (48 saat sonra).....	96
Şekil 8.13. RD hücre hattına 6.25 µM UA uygulanması (24 saat sonra).....	97
Şekil 8.14. RD hücre hattına 50 µM UA uygulanması (24 saat sonra).....	97
Şekil 8.15. RD hücre hattı negatif kontrol (24 saat sonra).	97
Şekil 8.16. RD hücre hattına 50 µM UA uygulanması (48 saat sonra).....	98
Şekil 8.17. RD hücre hattına 200 µM UA uygulanması (72 saat sonra).....	98
Şekil 8.18. RD hücre hattı pozitif kontrol (72 saat sonra).....	98
Şekil 8.19. Vero hücre hattına 25 µM UA uygulanması (24 saat sonra).....	99
Şekil 8.20. Vero hücre hattına 100 µM UA uygulanması (72 saat sonra).....	99
Şekil 8.21. Vero hücre hattı negatif kontrol (72 saat sonra).....	99
Şekil 8.22. Vero hücre hattı pozitif kontrol (72 saat sonra).	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

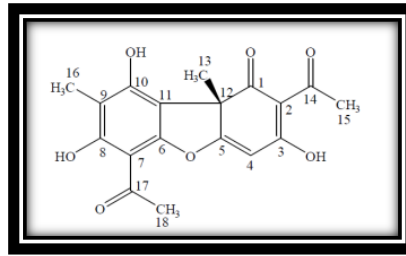
Çizelge 2.1. Kadınlar arasında görülen en yaygın 10 kanser türünün oranı (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide), Türkiye (33).	4
Çizelge 2.2. Erkekler arasında görülen en yaygın 10 kanser türünün oranı (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide), Türkiye (33).	5
Çizelge 2.3. Usnik asit etki mekanizmaları (102)	13
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları.	16
Çizelge 4.2. Kullanılan cihazlar listesi.	17
Çizelge 4.3. Total RNA ve primer konsantrasyonu	26
Çizelge 4.4. Ters Transkripsiyon (RT-PCR) Reaksiyonu Komponentleri	27
Çizelge 4.5. Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program.....	27
Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri	28
Çizelge 4.7. Real Time PCR komponentleri	29
Çizelge 4.8. Real Time PCR deney programı	30
Çizelge 5.1. Saf ve ticari usnik asit uygulaması sonrası hücre canlılığı (%) ortalama sonuçları (*UA: Usnik Asit).	33
Çizelge 5.2. EC50 değerleri.....	62
Çizelge 5.3. Total RNA izolasyonu sonucu miktar ve saflık oranları m.....	63
Çizelge 5.4. Usnik asit uygulanmış farklı hücre hatlarından elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların miktar ve saflık tayinleri	64

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FCS	Fetal Sığır Serumumu (Fetal Calf Serum)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
UA	Usnik Asit
QRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)

1. GİRİŞ

Kanser tedavisinde temel olarak cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Tüm bu tedavi yöntemlerinin kanser hastaları üzerinde bazı yan etkiler göstermesi ve tedavi sürecinin uzun süreli olması nedeniyle alternatif tedavi yöntemleri arayışı her geçen gün artmaktadır. Bu amaç doğrultusunda son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerine karşı sentetik ve biyolojik kaynaklı özellikle bitkisel ve fungus kaynaklı aday moleküllerin antikarsinojenik etkisinin tespiti araştırılmaya başlanmıştır. Devam eden araştırmalardan elde edilen sonuçlar; fungusların bir alt grubu olan likenler ve likenlere özgü sekonder metabolitlerin de kanser tedavisinde çözüm olabileceği konusunda umut vaatmiştir (1,2). Likenler; mantarların alglerle bir araya gelerek meydana getirdikleri morfolojik ve fizyolojik birlikler olarak tanımlanmaktadır. Likenler, 'likin maddeleri' adı verilen ve pek çoğu likenlere özgü olan çeşitli metabolitler sentezlemektedir (3). Likin maddeleri aminoasit türevleri, şeker alkolleri, alifatik asitler, γ , δ - ve makrosiklik laktonlar, monosiklik aromatik bileşikler, kinonlar, kromonlar, ksantonlar, dibenzofuranlar, depsidler, depsidonlar, depsonlar, terpenoidler, steroidler ve karotenoidler gibi bileşikler de içine alır (4). Likenlerden elde edilen ve üzerinde en çok çalışılmış bir sekonder metabolit olan **usnik asit** ilk kez 1844 yılında Alman bilim adamı Knopp tarafından izole edilmiştir (5). Dibenzofuran türevi olan usnik asit IUPAC ismi 2,6-diasetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3(2H)benzofuran-2(1H)-on olup $C_{18}H_{16}O_7$ kimyasal yapısına sahiptir (Şekil 1.1) (5).



Şekil 1.1. Usnik asit formülasyonu (5).

Usnik asit oda sıcaklığında katı, sarı renkli ve acı tatlı kortikal bir pigmenttir. Usnik asit molekül yapısında bir kiral merkez içerdiği için doğada D- veya L- formlarında ya da

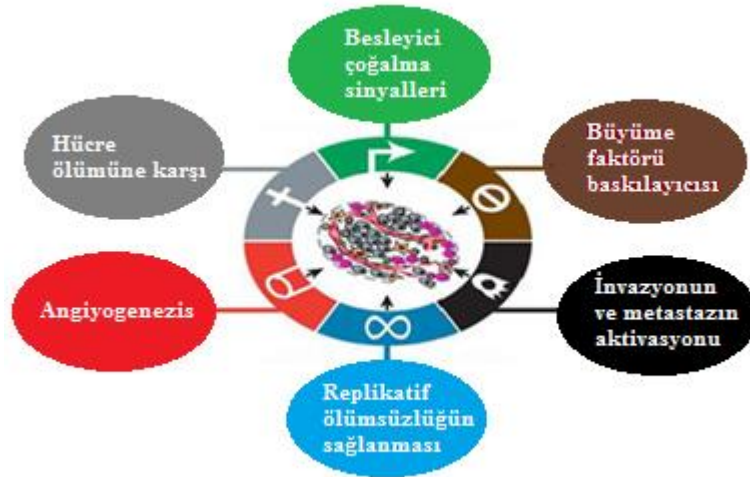
rasemik karışım olarak bulunmaktadır ve her iki formuda aktif biyolojik özellik göstermektedir (5). Usnik asit *Usnea*, *Alectoria*, *Cladonia*, *Ramalina*, *Lecanora*, *Parmelia*, *Rhizoplaca* ve *Evernia* cinsine ait liken türlerinde nispeten fazla miktarda sentezlendiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (5). Usnik asit içeren birçok medikal veya kozmetik amaçlı ürün günümüzde kullanılmaktadır (5). Krem, deodorant, diş macunu, ağız suyu ve güneş koruyucularının içinde usnik asit bulunmaktadır. Usnik asit Asya, Afrika ve Avrupa'da değişik amaçlarla kullanılmıştır. Örneğin ağrı kesici, ateş düşürücü, yara iyileştirici ve ekspektoran olarak kullanıldığı belirtilmektedir (6,7). Bu maddenin aynı zamanda antitüberküloz, antibakteriyel, antiprotazoal, antimikotik, antiviral, antiülser, antiproliferatif, antienflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkinliklerini incelemek için yapılan çalışmalar mevcuttur (8-24).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KANSER

Kanser en kısa tanımıyla, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmalarıdır (25). Kanser hücrelerinde normal hücre çoğalmasında ve homeostazis düzenleyici sistemde hasar oluşmuştur. 100'den fazla tipte kanser vardır ve spesifik organlarda tümörlerin alt tipleri de bulunabilmektedir (26). İnsanda tümör oluşumu çok basamaklı bir süreçtir ve bu basamaklar normal hücreden maling hücreye dönüşümde oluşan genetik süreci yansıtır (27). Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin sürekli mutasyonları sonucu farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunur (28). Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlara oldukça sık rastlanmaktadır (29). Sinyal iletiminde oluşan değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin düzenlenmesini ortadan kaldırmaktadır. Böylelikle, onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır (30).

Tipik olarak kanser yolakları bir kanser tipine veya farklı kanser tiplerine sahip bireylerde aynı regülatör sistemlerin farklı bileşenlerindeki değişimlerle ortaya çıkabilirler. Kanserlerin gelişim süreci içerisinde invazyon ve metastazın aktivasyonu, replikatif ölümsüzlüğün gerçekleşmesi, besleyici çoğalma sinyallerinin ortaya çıkması ve anjiogenezis gibi değişimler meydana gelmektedir (31) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanser gelişim süreci (31).

2.1.1. KANSER HASTALIĞI GÖRÜLME SIKLIĞI

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser hastalığında ölüm oranının yüksek olması ve oldukça sık görülmesi önemli bir halk sağlığı sorunudur (25). Uluslararası Kanser Ajansı 2012 yılı kanser hastalığı görülme sıklığı tahminlerine göre Dünya’da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiştir ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir (32). Dünya’da en çok tanı konulan kanserler akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) kanserleri iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mide (%8,8) kanserlerinden gerçekleştiği belirtilmiştir (33). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerine göre Türkiye’de 2002-2009 yılları arasında kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir ve bunu tiroid ve kolorektal kanserleri takip etmektedir (33). Aynı yıllar içerisinde erkekler arasında ise en sık görülen kanser türleri trake, akciğer, bronş kanserleri, prostat kanseri ve mesane kanseridir (34) (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Kadınlarda görülen en yaygın 10 kanser türünün oranı (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide), Türkiye (33).

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Meme	31,9	33,9	34,7	35,0	37,6	35,9	40,7	40,6
Tiroid	3,5	5,1	7,3	9,6	10,8	14,4	16,2	18,6
Kolorektal	9,3	10,3	11,3	11,1	12,5	12,3	13,2	13,4
Korpus Uterus	4,3	5,9	7,6	7,1	8,4	8,7	8,6	9,3
Trake, Akciğer ve Bronş	5,2	5,8	7,4	7,4	7,7	7,8	8,2	8,1
Mide	6,0	6,9	6,4	6,9	7,6	8,4	7,7	8,1
Ovaryum	5,9	6,2	5,8	5,6	5,9	6,5	6,9	6,9
Non-Hodgkin Lenfoma	1,2	1,4	4,4	4,0	4,9	5,2	5,0	5,3
Beyin, Sinir Sistemi	3,8	4,2	3,6	4,0	4,6	4,6	4,4	5,0
Serviks Uterina	3,9	4,7	4,5	4,4	4,8	4,3	4,1	4,5

Çizelge 2.2. Erkekler arasında görülen en yaygın 10 kanser türünün oranı (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide), Türkiye (33).

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Trake, Akciğer ve Bronş	42,2	43,5	65,1	65,9	68,9	73,0	69,2	66,0
Prostat	11,5	14,0	24,9	28,6	28,9	32,3	37,6	36,1
Mesane	12,4	13,7	19,3	20,6	21,0	22,5	21,7	21,4
Kolorektal	11,8	13,8	16,5	16,2	18,2	19,1	20,8	21,0
Mide	11,6	12,0	14,1	14,9	14,8	17,3	18,0	16,2
Larinks	6,9	8,4	10,0	8,9	9,7	9,3	9,1	8,1
Non-Hodgkin Lenfoma	1,4	2,5	6,3	5,9	6,9	7,6	6,9	7,2
Böbrek	3,0	3,2	4,1	4,1	5,5	5,2	5,8	6,3
Pankreas	3,1	3,1	4,0	4,4	5,2	6,3	6,1	5,4
Beyin, Sinir Sistemi	5,3	4,7	4,7	5,7	5,4	5,8	6,1	5,4

Kansere yakalanan kişi sayısının yıllar içinde gösterdiği artış nedeni ile 2025 yılında kanser vakalarının sayısının dünya çapında 25 milyonu aşacağı öngörülmektedir (34).

2.1.2. KANSER TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Kanser tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler; cerrahi işlemler, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi ve lazer tedavisi yöntemleridir (35). Cerrahi yöntem yayılım yapmamış birçok tümör için uygun bir tedavi yöntemi olması nedeniyle kanser tedavisinde en sık kullanılan yöntemdir (35). Eğer tümör ilerlemişse ve çevre dokulara yayılmış durumda ise cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi ile birlikte uygulanabilmektedir (35). Kanser tedavisinde radyasyon tedavisi ise X ışınları, gama ışınları ve elektronlar gibi iyonize ışınların kullanılmasını ve mevcut ışınların kanserli hücreyi tahrip etmesi ile etki etmektedir (36). Yine immünoterapi, BCG (verem) aşısı, interlökin ve interferonlar gibi biyolojik moleküller kullanılarak bağışıklık sisteminin uyarılması tedavide kullanılan yöntemler arasındadır (25). Hormon tedavisi ise hormon sekresyonuna bağlı gelişen özellikle meme ve prostat kanseri gibi kanserlerde özel bazı hormonların kullanımı yöntemi ile uygulanan tedavi yöntemidir (25). Lazer tedavisi, cerrahi müdahalelerde yararlı olabilmektedir (25). Kemoterapi ise, kanserin çeşitli ilaç kullanılarak tedavi edilmesi yöntemidir ve oldukça fazla kullanılan bir tedavi yöntemidir. Ancak kemoterapide kullanılan ilaçlar kanserli hücrelerin çoğalmalarını durdurmakta ve yok etmesine karşın normal hücrelere de etki edebilmekte ve büyük oranda hastada yan etkilere yol açabilmektedir (25). Bu nedenle; tümörlü dokuya

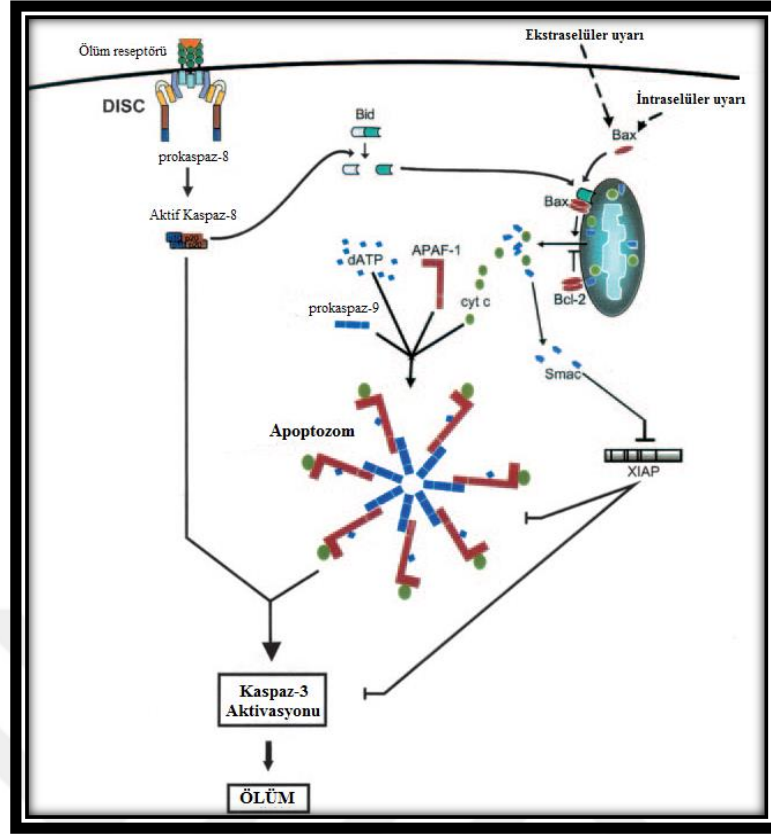
özgü ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. İlacın sağlıklı dokularda daha az birikmesinin ve tümörlü bölgede tercihen yoğunlaşmasının bir sonucu olarak ilaç toksisitesi azalım göstermektedir. Bu durum ise uygulanan ilacın kanser hücrelerine selektif olarak hedeflendirilmesi ile mümkündür. Bu seçici hedeflenme ile istenmeyen yan etkiler azalmakta, en uygun terapötik yanıt elde edilmekte ve yüksek dozlarda toksik etkileri gözlenen maddeler güvenli olarak kullanılabilirler (37). Örneğin, Avastin ve Erbitux 2004 yılında, Panitumumab ise 2006 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onay alınmış olup klinikte kullanımı sağlanmıştır. Kimyasal kökenli farmakolojik ajanlar genellikle ya doğal ya da sentetik kaynaklı olarak elde edilmektedir (38, 39). Doğal ürünlere örnek olarak vincristine (40), paclitaxel (41), homoharringtonine (42), etoposide (43) ve camptothecin (44) türevleri verilebilir. Bunların arasında bitkilerden elde edilen kimyasal bileşiklerin en güvenli ve en etkili olduğu tespit edilmiştir (45). Gerçekleştirilen birçok çalışmada bitkilerden elde edilen kimyasal bileşiklerin çoğunlukla normal dokulara toksik etki etmediği ve güçlü antikanser etkisine sahip oldukları gösterilmiştir (45). Özellikle son yıllarda bitki ve fungus kaynaklı elde edilen ekstraktlar ile yapılan çalışmalar ümit verici sonuçlar içermektedir. Ayrıca liken metabolitleri egzema, solunum ve dolaşım yolu gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabilirler (46,47). Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde bitki ekstraktları farklı kanser hücrelerine karşı etkisi ile ilgili çalışmalar yoğun şekilde yürütülmektedir (48-52). Pathak ve arkadaşları (2000) yapmış oldukları çalışmada, insan, fare ve köpek tümör hücrelerinde, farklı konsantrasyonlarda anvirzel (1 ng/ml-500 µg/ml) ve oleandrinin (0,01 ng/ml-50 µg/ml) tümör öldürücü etkisini araştırmışlardır. İnsan kanser hücrelerinde her iki ekstraktın da etkili olduğu, diğer yandan fare kanser hücrelerinde oleandrinin anvirzelden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (53). Wang ve arkadaşları (2000) kanser tedavisinde zakkum ekstraktının LC/MS/MS analizleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Aynı zamanda anvirzelin kas içi enjeksiyonunu takiben insan plazmasında oleandrinin, neritalosid ve odorosid'in belirlenmesi için analitik bir metot uygulamışlardır (54). Mc Conkey ve arkadaşları (2000), anvirzelin insan tümör hücrelerinde etkili olduğunu yapmış oldukları klinik çalışmalar sonucu belirtmiştir. Bu etkilerin *Nerium oleander*'in antitümör aktivitesinden kaynaklandığı tespit edilmiştir ve oleandrinin anvirzel'den 50 kat daha fazla etkili olduğunu belirtilmiştir (55). Bazı *Stachys* cinslerinin ekstraktları üzerine yapılan çalışmalarda pek çok türün iltihap önleyici, romatizma ve astım hastalıkları anti-

inflammator, antinefritik, hiyaluronik aktivite gibi çeşitli biyolojik aktivite gösterdikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (56-59). Afaq ve arkadaşları (2004), *Nerium oleander* yapraklarından elde edilen oleandrin'in anti-inflammatuar ve tümör hücrelerinin büyümesi üzerine etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonuçlarına göre oleandrin'in antitümör etkisini belirlemişlerdir (60). Pietsch ve arkadaşları (2005), oleandrin zehirinin ölümcül olmayan dozunun belirlenmesi üzerine, 47 yaşındaki bir bayan üzerinde klinik bir araştırma yapmıştır. Serum örneklerindeki oleandrin konsantrasyonunu yaklaşık 1,6 ng/ml olarak bulmuşlar ve bulguları daha önceki çalışmalarla karşılaştırmışlardır (61). In vitro yapılan çalışmalarda *Nerium oleander*'in çeşitli kanser hücreleri üzerinde antikarsinojenik etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada *Nerium oleander*'den izole edilen endofitik mantarların potansiyel bir antioksidan kaynağı olduğu belirlenmiştir (62). Sreenivasan ve arkadaşlarının (2006), yapmış oldukları çalışmada, bazı tümör hücrelerinde oleandrinin etkisini araştırmıştır. Araştırmalarının sonuçlarında oleandrinin tümör hücrelerinde apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (63). Likenler ve sekonder metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri üzerine uzun yıllardan beri çalışmalar yapılmaktadır (11,64-68). Yapılan literatür araştırmasında likenlerin antikarsinojen etkileri ile ilgili gerçekleştirilmiş çalışmalar ülkemizde ve dünya literatüründe 2011 yılından itibaren hızla yer almaya başlamıştır (69). Ancak, araştırmacılar tarafından sadece çok az sayıda liken bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri test edilmiştir.

2.2. APOPTOZİS

Apoptozis normal gelişim sürecinde, yaşlanmada ve dokudaki hücre popülasyonunu korumada homeostatik mekanizma olarak gerçekleşmektedir. Apoptozis ayrıca immün reaksiyonlarda ya da hücre hasarı meydana geldiğinde oluşan bir savunma mekanizması olarak görev yapmaktadır (70). İki ana apoptotik yolak vardır; ilki ekstrinsik ya da ölüm reseptörleri yolağı ikincisi de intrinsik ya da mitokondriyal yolağıdır. Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolakları transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar tümör nekrozus faktör (TNF) reseptör gen üst familyası üyelerini içeren ölüm reseptörlerini kapsamaktadır (71). TNF reseptör ailesi üyeleri ekstraselüler domainleri ve ölüm domainleri olarak adlandırılan yaklaşık 80 aminoasitten oluşan sitoplazmik domainlere sahiptir (72). Bu ölüm domainleri ölüm sinyallerinin hücre yüzeyinden intraselüler sinyal yolağına iletilmesinde önemli rol oynamaktadır. En iyi tanımlanmış ölüm reseptörleri FasL/FasR,

TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/ DR4 ve Apo2L/DR5' dir (73-76). Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolağında ise reseptör aracılı olmayan uyarılarla hedef hücre içinden gelen intraselüler sinyaller görev almaktadır. Bu sinyaller iç mitokondriyal membranda değişikliğe neden olmaktadır. Mitokondriyal porlar açılır ve proapoptotik proteinler ortaya çıkar (77). Apoptotik mitokondriyal olayların kontrolünde ve düzenlenmesinde Bcl-2 protein ailesi görev yapmaktadır (78). Tümör supressor protein olan p53 Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik role sahiptir (79). Bcl-2 protein ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol etmektedir. Bcl-2 ailesinde 25 gen tanımlanmıştır. Bunların bazıları Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG gibi antiapoptotik proteinler ve Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk gibi proapoptotik proteinlerdir. Bu proteinler apoptozun meydana gelişinde büyük öneme sahiptir (77). Apoptotik sinyallerin öncelikli amacı prokaspazların aktivasyonu ve mitokondriyal fonksiyonların devre dışı bırakılmasını sağlamaktır. Sistein proteazların bir alt sınıfı olan kaspazlar apoptozun yürütülmesinde merkezi rol oynamaktadır (80). Bu proteazlar genellikle inaktif zimojenler (prokaspazlar) olarak sentezlenirler. İnsan kaspazları apikal kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10 ve 12) ve efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6 ve 7) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Apikal prokaspazlar dimerizasyon ile aktif hale gelirler (81-83). Efektör prokaspazlar ise önceden aktive edilmiş apikal kaspazlar tarafından proteolitik yıkım sonucunda aktive edilir (84). Aktivasyondan sonra efektör kaspazlar hücrede proteolitik yıkımı gerçekleştirir (85). Şekil 2.2'de görüldüğü gibi ekstrinsik yolda ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile prokaspaz 8 aktifleşerek kaspaz 8 haline gelir. Aktif kaspaz 8 kaspaz 3'ü aktif hale getirerek hücreyi ölüme götürür. İntrinsik yolda ise intraselüler ve ekstraselüler ölüm sinyalleri mitokondriye taşınmaktadır. Bax, Bak, Sitokrom c, Smac/DIABLO ve diğer apoptojenlerin mitokondriden çıkmasını stimüle ederler. Bcl-2 ve Bcl-XL bu yolun aktifleşmesini engellemektedir. Sitokrom c, dATP, Apaf-1 ve prokaspaz 9 apoptozom içerisinde birleşirler ve prokaspaz 9 aktifleşir. Aktifleşen kaspaz 9 prokaspaz 3'ü aktifleştirir ve ölüm gerçekleşir. Apoptozom oluşumunu ve kaspaz 3 aktivasyonunu XIAP inhibe etmektedir (86).



Şekil 2.2. Apoptotik yolak (77).

2.3. TEDAVİ AMAÇLI KULLANILABİLEN BİYOLOJİK ORGANİZMA: LİKENLER

Mantarların bir alt grubu olan likenler; mantarların alglerle bir araya gelerek oluşturdukları morfolojik ve fizyolojik birlikler olarak tanımlanmaktadır. Likenler, mikobiyont olarak adlandırılan bir mantar ile fotobiyont bir fotosentetik yeşil alg ve/veya siyanobakterinin oluşturduğu sürekli ototrofik mutualistik birliklerdir. Liken oluşturan mantar bu birliktelikten daha fazla fayda sağlar. Alg ise serbest yaşayan formlarına göre daha zayıf gelişir. Bu nedenle günümüzde, liken birliğinin mutualizmden çok kontrollü parazitizm örneği olduğu kabul edilmektedir (87, 88). Liken birliklerinde mantar algi hayatsal işlemlerini devam ettirmek, büyümek ve üremek için gerekli olan karbon kaynağı olarak kullanırken alg ise fotosentez için gereken mineral ve suyu mantardan almasını sağlamaktadır (89-91). Son yıllarda özellikle biyoteknoloji alanında alternatif bir biyolojik organizma kaynağı tercih nedenlerinden biri olarak; likenler kök sisteminin ve kutikula tabakasının bulunmaması ile ihtiyaçlarından çok daha fazla kirleticileri biriktirebilme ve bu birikime yüksek derecede tolerans gösterebilme yeteneğine sahip biyolojik organizmalar

olmasından kaynaklanmaktadır. Likenler, ‘liken maddeleri’ adı verilen ve pek çoğu likenlere özgü olan çeşitli metabolitler sentezlemektedir (3). Liken maddeleri metabolik orijinlerine göre primer metabolitler (intraselüler) ve sekonder metabolitler (ekstraselüler) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Yapılan araştırmalar sonucunda yapısı bilinen liken maddelerinin sayısı 1050’den fazladır (92).

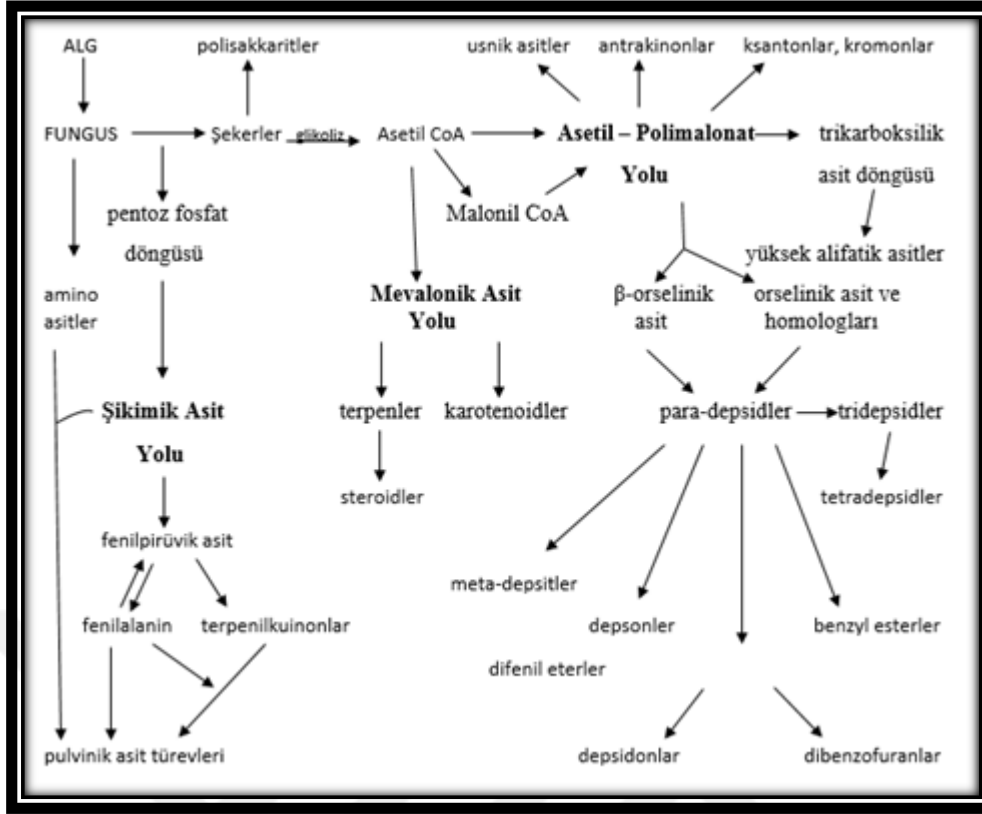
2.3.1. LİKEN PRİMER METABOLİTLERİ

Proteinler, amino asitler, polyoller, karotenoidler, polisakkaritler ve vitaminler primer metabolitlerdir (intraselüler). Bunlar hücre duvarı yapısında ve protoplastlarda bulunurlar ve sıklıkla suda çözünürler ve kaynayan suda ekstre edilebilirler (93). Bu ürünlerin bazıları funguslar tarafından bazıları algler tarafından sentezlenir. Birçok primer metabolit likenden izole edilebildiği gibi serbest yaşayan fungus, alg ve yüksek yapılı yeşil bitkilerden de izole edilebilir (94).

2.3.2. LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİ

Likenlerde bulunan organik bileşiklerin büyük bir bölümü, mantar hücresi içinde veya hiflerin yüzeyinde depolanan sekonder metabolitlerdir (ekstraselüler). Bu bileşikler genelde suda çözünmez sadece organik çözücülerle ekstre edilirler (88). Mantarlar liken içinde bu maddelerden bazılarını büyük miktarlarda (çoğunlukla toplam ağırlığın %5’ine kadar) üretebilmelerine rağmen tallustaki algden ayrı gelişen izole edilmiş mantarlar bu maddeleri az miktarda üretebilir (95, 96). Tallus korteksinde bulunan usnik asit, atranorin ile ksantonlar ve pulvinik asit türevleri gibi pigmentler hem liken tallusunda bulunan ışığa duyarlı algleri yoğun ışıktan korurlar hem de hoş olmayan tatları ile tallusun omurgasız hayvanlar tarafından yenilmesine engel olurlar. Liken maddeleri metabolik orijinleri dışında biyosentez yollarına göre de dört grup altında incelenebilir (Şekil.2.3) (88):

1. Poliketit yol ya da Asetil – polimalonat yolu
2. Mevalonik asit yolu
3. Şikimik asit yolu
4. Fikobiyontların fotosentetik ürünleri

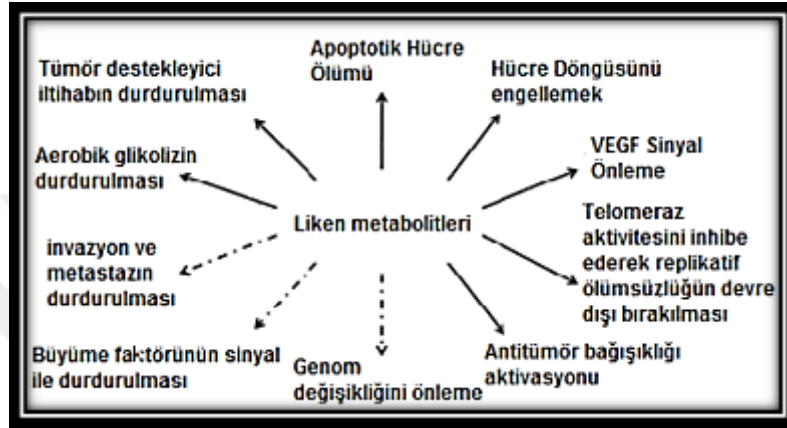


Şekil 2.3. Liken maddeleri biyosentez yolları.

Uzun zamandır hastalıkların tedavisinde kullanılan likenlerin iyileştirici özelliklerinin yapılarında bulunan asidik, çoğu fenolik karakterli depsit ve depsidon türevi liken metabolitlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (97). Asidik karakterli olmalarından dolayı bu metabolitlere "Liken asitleri" denmektedir. Likenlerin önemli boyar maddeleri ihtiva etmeleri ve güçlü antimikrobiyal özellikleri de likenlerin önemini artırmaktadır (98). Likenler birçok mikroorganizmalar, mayalar ve algler üzerine antibiyotik etki gösterdiği uzun yıllardan beri bilinmektedir (99). Denenen liken örneklerinin %50'sinden fazlasının antibiyotik etki gösterdiği, en etkili maddelerin ise usnik asit, pulvünik asit türevleri (örneğin; vulpünik asit) ve alifatik asitler olduğu ve bu maddelerin de özellikle gram-pozitif bakterilere ve bazı funguslara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (97). Bunlara ilaveten likenlerin herbisit (93, 100), antitümör (65) ve antioksidan (101) aktivite göstermeleri de diğer önemli özelliklerdendir.

Liken metabolitlerinin olası antikanser mekanizmaları literatürde yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmeye başlamıştır (102). 2015 yılında yapılan bir derleme çalışmasında günümüze kadar tamamlanmış çalışmalarda bazı liken sekonder metabolitlerin

antitumor immunitesinin aktivasyonu, telomeraz aktivitesini engellenmesi ile devamlı canlılığın sağlanabilmesi, VEGF sinyal inhibisyonu, hücre döngüsü, apoptotik hücre ölümü, inflamasyonun inhibisyonu, aerobik glikolizasyonun inhibisyonu üzerine çalışmalar olduğu gösterilmiştir. Ancak şu ana kadar metastazın engellenmesi, büyüme faktör sinyallerinin inhibisyonu ve genom değişkenliğinin baskılanması üzerine çalışmalar literatürde yerini almamış olup bu alanlarda liken sekonder metabolitlerinin etkisi henüz araştırılmamıştır (Şekil 2.4) (102).



Şekil 2.4. Liken sekonder metabolitlerinin olası antikanser mekanizmasının şematik gösterimi (kesin çizgi olanlar araştırılanlar, kesikli çizgi olanlar hala üzerine çalışılmamış olan mekanizmalar) (102).

2.3.3. USNİK ASİT

Usnik asit, en çok çalışılan liken bileşiklerinden biri olup Lewis akciğer karsinomu, fare P388 lösemi ve diğer birçok kanser tipine karşı etkili olduğu bildirmiştir (64, 65). Usnik asit liken bileşiğinin kanser hücrelerine anti-mitotik etkisi olduğu bulunmuştur (103). Ayrıca, Bezivin ve ark. (2004) usnik asitin kanser hücrelerinde apoptozu başlattığını doğrulamıştır (104). Her ne kadar bazı diğer liken sekonder metabolitlerinin anti-proliferatif etkileri denenmiş olsa da elde edilen mevcut veriler oldukça azdır (11, 105, 106). Usnik asit sekonder metabolitinin bugüne kadar çalışılmış mekanizmaları Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Usnik asit etki mekanizmaları (102).

Liken Sekonder Metaboliti	Mekanizmalar	Referans
Hücre döngüsü		
Usnik asit	G0/G1 -siklin D1 siklin-bağlı kinazlar (CDKs) ve siklin-bağlı kinaz inhibitör (CDK1) protein ekspresyon düzeyi	(2)
(+) ve (-) Usnik asit	S fazı içinde hücre döngüsü sonlanma inhibisyonu	(107)
Usnik asit, Atranorin	S fazı içinde hücre döngüsü	(108)
Apoptotik hücre ölümü		
Usnik asit	Mitokondriyal membran depolarizasyonu ile apoptotik hücre ölümü	(2)
Usnik asit, Atranorin	Programlı hücre ölümü aktivasyonu ve mitokondriyal membran potansiyelinin kütleli kaybı	(109)
Anti-inflammatör etki		
Usnik asit	TNF- α ve INOS ekspresyonu	(110)
Anti-tümör immünitesi		
Usnik asit	Endotelial hücre çoğalımı inhibisyonu, Endotelial hücrelerin morfolojisinde apoptotik hücrelerin belirlenmesi VEGFR-2	(111)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Günümüzde kanser henüz çözümlenememiş önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser tedavisinde temel olarak cerrahi, kemoterapi ve hormon tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan bu temel yöntemlerin ve ilaçların bazı yan etkilere sahip olması nedeniyle tedavide yetersiz olduğu görülmektedir. Alternatif bir biyolojik organizma olarak liken sekonder metabolitlerinin antikarsinojenik etki göstermeleri ile ilgili gerçekleştirilmiş çalışmalar ülkemizde ve dünya literatüründe son yıllarda yer almaya başlamıştır. Fakat gerçekleştirilen çalışmalarda sınırlı sayıda liken sekonder metaboliti kullanılmış ve sadece birkaç tipte kanser hücresine etkisi gözlemlenmiştir. Bu nedenle gerçekleştirilen tez kapsamında ülkemiz ve dünya literatüründe daha önce çalışılmamış farklı kanser hücre tiplerine karşı liken sekonder metabolitlerinden birisi olan usnik asit'in hücre canlılığı üzerine etkisinin test edilmesi öncelikle amaçlanmıştır. Tez kapsamında ticari olarak satın alınmış usnik asit ile tarafımızca doğadan toplanmış *Usnea diffracta* liken türünden izole edilmiş usnik asit'in farklı tipte kanser hücre hatları üzerine hücre canlılığı etkisi karşılaştırılmıştır. Doğal ortamından toplanan liken örneğinden izole edilen usnik asit veya ticari usnik asit sekonder metabolitinin kullanım etkinliğinin belirlenmesi ve sonrasında hücre canlılığı üzerine olan etkisinin tespiti ve farklı kanser tiplerinde (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD ve Wehi) en etkin olabileceği dozun tespiti ile umut verici ilaç aday molekülleri olabileceğinin gösterilebilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca liken sekonder metabolitlerinin apoptotik etki gösterdiği yapılan çalışmalarla bilinmektedir. Bu anlamda, tez kapsamında, ilk defa usnik asit uygulaması sonrasında mRNA boyutunda apoptozla ilişkili genlerin ifadesindeki değişimler incelenmiştir. Tez sonuçları temel alınarak, ilerleyen çalışmalarda henüz çalışılmamış olan usnik asitin kanser spesifik sinyal hedef yolları üzerine moleküler boyutta etkisi detaylıca araştırılması hedeflenmektedir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. GENEL REAKTİFLER

Usnik asit sekonder metabolitinin izolasyonu için aseton (MERCK, K32927313409), metanol (Sigma, 095K8804) ve fosfat tampon (Sigma, 044H8880) kullanılmıştır. Hücre hatlarının çoğaltılması için Modified Eagle's Medium (MEM) (PAA [The Cell Culture Company], E08209-2261), besiyeri kullanılmıştır. Besiyerine fetal calf serum (FCS) (Stem Cell, 04F11678) ve Penisilin/Streptomisin (Biowest, S12204L0018) kullanılmıştır. Hücrelerin yıkanması için PBS (PAA [The Cell Culture Company], H00210-0647) ve hücrelerin plakalardan kaldırılması için Tripsin-EDTA (Stem Cell, 05A13807) kullanılmıştır. Çözücü olarak DMSO (Sigma, 049K2387) kullanılmıştır. RNA izolasyonu için TRizol (Genexol, XN19001), kloroform (MERCK, K02545831341), izopropanol (EMSURE, K44834034334) ve etanol (MERCK, K38999227830) kullanılmıştır.

4.1.2. LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİ

Tez kapsamında kullanılacak usnik asit sekonder metaboliti; daha önce araziden Doç. Dr. Demet Cansaran Duman tarafından toplanılmış ve teşhis edilmiş *Usnea diffracta* liken türünden izole edilmiş olan hem de üretici firmadan ticari olarak temin edilmiş usnik asit (ALDRICH, MKBK4696V) ile de denenmiştir.

4.1.3. KANSER VE NORMAL HÜCRE HATLARI

Deneyler, T.C. Tarım Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre Bankası'ndan temin edilen CaCo2 (insan kolorektal adenokarsinoma hücreleri), HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma hücreleri), Hep2C (insan HeLa karsinoma hücreleri), RD (insan rabdomiyosarkoma hücreleri), Wehi (fare fibrosarkoma hücreleri) kanser hücre hatları ve normal hücre hatlarından L929 (fare subkutanöz bağ doku hücreleri) ve Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri) kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları.

Kanser Hücre	Normal Hücre
CaCo2	L929
HepG2	Vero
Hep2C	
RD	
Wehi	

4.1.4. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

Kanser ve normal hücrelerin ticari ve doğal usnik asite olan hassasiyetleri MTT (Hücre proliferasyon reaktifi) (Sigma, MF6004) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

DMEM F12 (Dulbecco's Minimum Essential Medium) Besiyerinin Hazırlanması

L-Glutamine içeren 500 ml DMEM F12 içerisine %1 Penisilin-Streptomisin ve %10 FCS eklenerek besiyeri hazırlanmıştır.

Çözücü (DMSO) Hazırlanışı

DMSO (Sigma, 049K2387) 1M olarak satın alınmıştır. Ticari ve doğal usnik asit sekonder metabolitlerini son konsantrasyonu DMSO'nun toksik etkisinin en aza indirmek amaçlı 14 mM olacak şekilde DMEM ile seyreltilmiştir.

MTT Çözeltisinin Hazırlanması

50 mg MTT reaktifine 10 ml PBS eklenmiştir. Çözelti 0,45µm'lik filtreden geçirilmiştir. MTT reaktifinin ışığa hassasiyeti nedeni ile çözelti hazırlığı karanlıkta yapılmıştır. Elde edilen stok solüsyon bu haliyle +4°C'de en fazla bir ay karanlık ortamda saklanabilir.

Amonyum Molibdat Hazırlanışı

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak Amonyum Molibdat reaktifi kullanılmıştır. 124 mg Amonyum molibdat 10 ml DMEM besiyerinde çözülerek hazırlanmıştır.

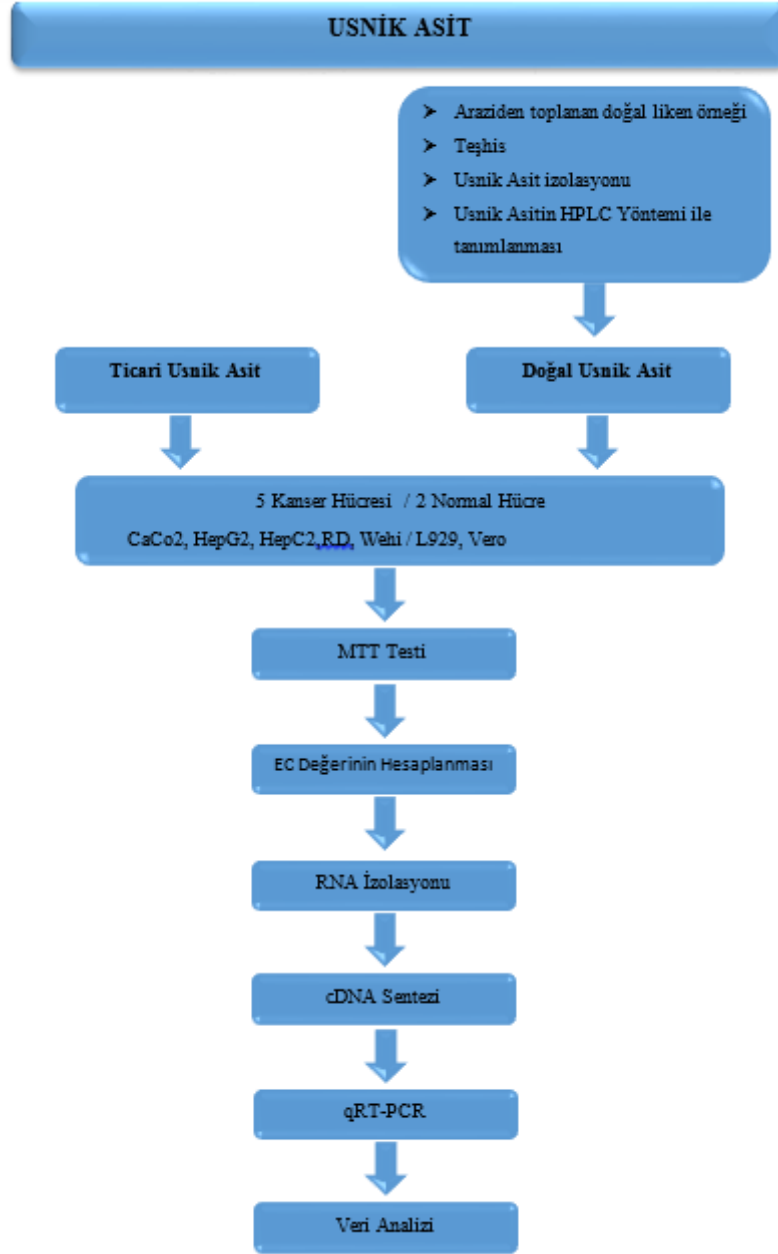
4.1.5. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu tez kapsamında Çizelge 4.2’de belirtilen cihazlar kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. Kullanılan cihazlar listesi.

Cihaz Adı	Markası
HPLC	Thermo
Laminar Flow Kabin	Holten LaminAir Model 1,8
Mikroskop	Leica DCF290
Terazi	Shimadzu AX200
Shaker	Finepcr Orbital Shaker SH30
CO ₂ İnkübatör	Sanyo CO ₂ Incubator
Su Banyosu	Lab-Line Aquabath
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Rotina 35R
Nanodrop	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
Real Time PCR	Roche Light Cycler 480
Görüntüleme Sistemi	Syngene Gene Genius Bio Imaging

4.2. YÖNTEM



Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması ve deney tasarımı.

4.2.1. LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİNİN ÇÖZÜLMESİ VE UYGUN KONSANTRASYONLARIN HAZIRLANMASI

Ticari Usnik Asit:

Moleküler ağırlığı (mA) 344,32 g/mol olan usnik asit'den (Şekil 4.2) öncelikle çalışılacak stok konsantrasyon olan 400µM usnik asit konsantrasyonu 14mM DMSO (ve/veya 2-

hydroxylpropyl-beta-cyclodextrin) ile hazırlanmıştır. Çalışılacak diğer konsantrasyonlar (200, 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 μM) 400 μM usnik asit konsantrasyonunun ileri dilusyonları ile hazırlanmıştır.



Şekil 4.2. Usnik asit.

Doğal Usnik Asit:

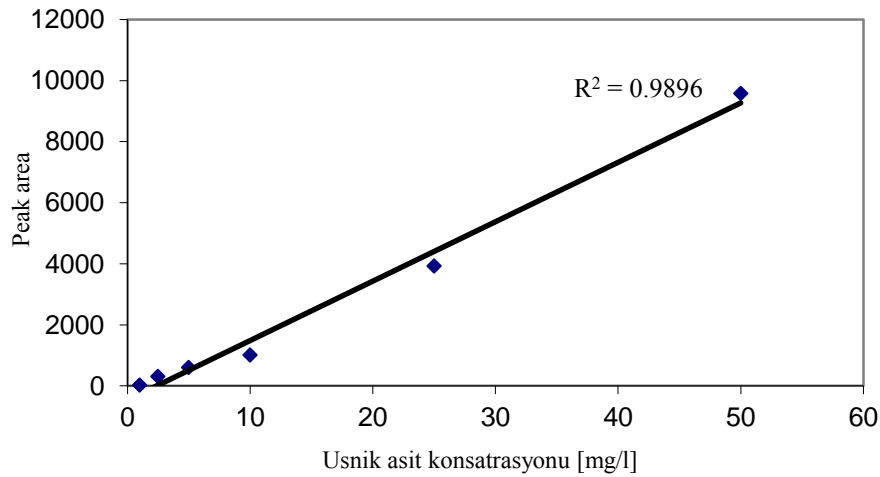
Çalışmada kullanılan *Usnea diffracta* liken türü 2014 yılında, Trabzon Uzungöl Soğanlı (37°61'E, 44°84'N, 1799 m) mevkilerinden Doç. Dr. Demet Cansaran DUMAN tarafından toplanmıştır. Toplanan örneklerin tür teşhisi, Wirth (1995) ile Purvis ve arkadaşları (1992) tarafından tanımlanan anahtarlara göre yapılmıştır (112, 113) .

4.2.2. DOĞAL USNİK ASİT'İN İZOLASYONU VE HPLC YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Usnea diffracta liken türünden usnik asit izolasyonu için kurutulmuş liken örnekleri toz haline getirilerek vidalı kapaklı cam tüplere konulmuştur. Liken örnekleri 0,05g/ 10ml olacak şekilde aseton (Sigma) içerisinde, oda sıcaklığında (20-22 °C) bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler HPLC'de analize alınmaya kadar +4°C'de karanlıkta saklanmıştır. Analiz öncesi tüm örnekler 0.45 μm gözenek çaplı filtrelerden (Sartorius) geçirilerek 20 μl 'lik hacimde HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Standartlar ve Çözücüler

Usnik asitin (Sigma) stok solüsyonu 1mg/ml konsantrasyonunda aseton içerisinde hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu stok çözeltiden aseton ile seyreltilerek yapılmıştır (0,01 ppm-50 ppm). Tüm standartlar otomatik örnekleyiciye konmuş ve analiz edilmiştir. Usnik asit için kalibrasyon eğrileri çeşitli konsantrasyonlardaki yedi örnekten lineer regresyon analizi ile elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Usnik asit'in kalibrasyon eğrisi.

Analiz Koşulları ve Aletler

Deneilerimizde Surveyor LC pompa, Surveyor fotodiyot dizi detektörü, Surveyor oto örnekleyici, ChromQuest 4.01 veri işlemcisinden oluşan Thermo Finnigan HPLC sistemi kullanılmıştır. Ters faz Shim-pack CLC-ODS (M), 5 µm partikül boyutlu, 250 mm x 4.6 mm iç çapında paslanmaz çelik kolon (C18) kullanılmıştır. Akış hızı 0.8 ml/dak. olarak seçilmiştir. Usnik asitin 245 nm'de belirlenmesi için metanol fosfat tamponu (pH 7.4) (70:30 v/v) hareketli faz olarak kullanılmıştır (114-116). 20 µl lik hacimlerde örnekler HPLC sistemine üç defa enjekte edilmiştir. Her bir analiz için ortalama değer hesaplanmıştır.

4.2.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE İDAMESİ

CaCo2, HepG2, Hep2C, RD, L929 ve Vero hücrelerinin çoğaltılması aşamalarında %10 FBS, 2 mM Lglutamin, %1 penisilin + streptomisin içeren DMEM (PAA Laboratories, Austria) besiyeri kullanılmıştır. Wehi hücreleri ise RPMI-1640 besiyerinde çoğaltılmıştır.

Sıvı azot tankında donmuş haldeki hücreler çıkartılarak 37°C'deki su banyosunda yaklaşık 2-3 dk süre ile çözdürülür ve olası kontaminasyonu önlemek için tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar kabin içerisine alınır. Laminar kabin içerisinde 15 ml'lik falkon tüpe 5 ml %10 FCS içeren DMEM F12 besiyeri konulmuştur ve sıvı azot tankından çıkarılarak ayrı ayrı çözülen CaCo2, HepG2, Hep2C, RD, L929 ve Vero hücreleri falkona aktarılmıştır. Wehi hücreleri ise RPMI-1640 besiyeri içeren falkona aktarılmıştır. Falkon 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır ve pellet el yardımı ile hafifçe vurularak süspanse edilmiştir. Flask 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre kapağı hafif açık olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık iki günlük inkübasyon sonrasında flask inkübatörden alınmıştır ve laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri dökülüp ve flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 2ml PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra PBS dökülmüştür ve 2ml Tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flaska besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktararak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmıştır ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti süspanse edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan yedi farklı hücrelerden pasaj yapılması için ayrılan kısım %90 nem 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir sonrasında kalan dondurularak sıvı azot tankında depolanmıştır.

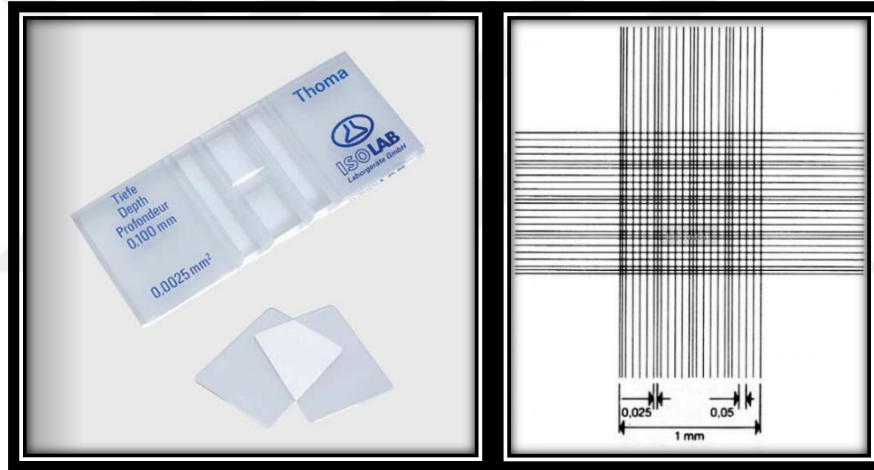
4.2.4. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN HÜCRE SAYISININ OPTİMİZE EDİLMESİ VE PLATE YERLEŞİMİ

Deneyleer için 96 kuyucuklu mikroplaklar kullanılmıştır. Mikroskopta deneyleerde kullanılacak uygun hücre sayısının belirlenebilmesi amacıyla beş farklı kanser hücrelerinin her bir hücre sayısı için beş ayrı kuyucuğa ekim yapıldı. Her biri 5000, 7000 ve 10000 hücre içeren 100 µl DMEM besiyeri her bir kuyucuğa ekilip sonrasında mikroplak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu. Her 24 saatte bir mikroplakta hücrelerin çoğalması mikroskopik olarak gözlemlendi. Deney sonucunda çalışılacak tüm hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak uygun olan hücre miktarı her bir kuyucuk için 10000 (1x10⁴) hücre olarak saptanması uygun görülmüştür.

4.2.5. HÜCRE SAYIMI

Santrifüj sonrasında falkon tüpün dip kısmında kalan hücrelerden 10µl çekilerek bir ependorf tüpüne konulmuştur. Üzerine 90 µl besiyeri ve 48 µl tripan blue eklenmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra karışımdan 10 µl çekilerek thoma lamına yayılmıştır. Thoma lamının alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücreler mikroskop altında 10X objektif büyütmesinde sayılıp aritmetik ortalamaları alınmıştır (Şekil 4.2.). Tripan blue ölü hücrelerin içine girme özelliğindedir ve bu nedenle sayım yaparken koyu mavi gözüken hücreler ölü, açık renkteki parlak hücreler canlı olarak sayılmıştır. Thoma lamında hücreler sayıldıktan sonra aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı elde edilmiştir.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \frac{\text{Ortalama Sayılan Hücre Sayısı} \times \text{Mikroskop Büyütme Oranı} \times \text{Seyreltme Oranı}}{4}$$



Şekil 4.4. Thoma Lamı ve Thoma lamının sayım yapılan kareleri.

4.2.6. LİKEN SEKONDER METABOLİTİNİN FARKLI TİPTEKİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MTT TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Nitel değerlendirme

Hücreler plaklara ekilerek inkübatöre koyulduktan sonra %80 doluluğa ulaşması beklenilmiştir. Ticari ve doğal usnik asit sekonder metaboliti taze olarak DMSO (Sigma) içerisinde çözülmüştür. Daha sonra hücrelerin üzerlerine 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 µM dilüsyonlarda hazırlanan usnik asit sekonder metabolit derişimleri uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saat %90 nemli, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletildikten sonra hücreler

mikroskopla incelenerek genel morfoloji, vokuolizasyon (boşluk oluşması), hücre kalkması, hücre yıkımı ve membran bütünlüğündeki değişiklikler değerlendirildi.

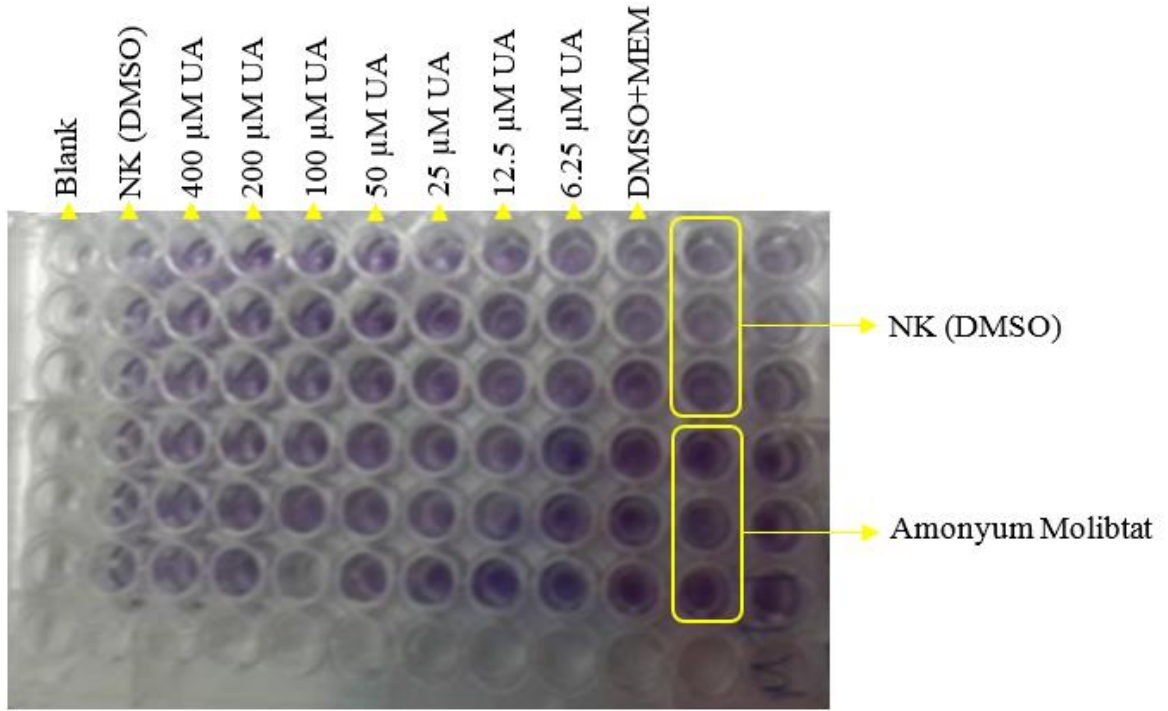
Nicel Değerlendirme (MTT Testi Yöntemi)

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kalorimetrik olarak ölçülmesini sağlar. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen besiyeri veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözülemez formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan bir çözücü yardımı ile çözülebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup değerlendirilir. Böylece hücrelerin canlılığı ve çoğalmaları takip edilebilir (117, 118).

MTT testi için gerekli olan usnik asit sekonder metaboliti dilüsyonları, pozitif (Amonyum Molibdat) ve negatif kontrol (DMSO ve DMEM), MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) boyası aynı gün hazırlanarak taze olarak kullanıldı.

Ticari ve doğal usnik asit için MTT testi, 96 kuyulu plaklara 100 µl besiyeri içinde 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat inkübe edilen hücrelerin üzerine hazırlanan 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 µM konsantrasyonlardaki 100µl usnik asit konsantrasyonları altı tekrarlı olarak eklendi ve 24 saat daha 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.3). 24 saat sonra usnik asit sekonder metaboliti çekilip hücrelerin üzerine 50 µl MTT eklendi ve dört saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası kuyulardaki MTT çözeltisi çekilip her kuyucuğa 100µl isopropanol eklendi ve çalkalayıcıda 2-3 dk bekletildikten sonra plakların spektrofotometrik olarak 570 nm (referans 650 nm)'de absorbans değerleri okunmuştur. Aynı deney protokolü 48 saat ve 72 saat içinde uygulanmıştır ve absorbans değerleri okunmuştur. Sitotoksitesiyi değerlendirmeden önce, hüresiz kuyulardaki OD değerleri (sadece besiyeri + MTT), özütlerin bulunduğu kuyucukların OD değerlerinden çıkarılmıştır. Numunelerin toksisitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Canlılık hesabının yapılması için; OD değeri (ilaç) / OD değeri (Hücre Kontrol) *100 formülü kullanılmıştır.



Şekil 4.5. MTT testi (Hep2C-48 saat, NK: Negatif Kontrol, UA: Usnik Asit).

Sonuçta elde edilen absorbans değerlerine ait veriler ile EC50 değeri ve canlılık oranları hesaplanmıştır. EC50 değerinin hesaplanması için absorbans değerleri (OD değerleri) logaritma tabanına çevrilmiş, daha sonra Graphpad Prism 6 programı kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

Graphpad Prism 6 ile eğrinin EC50 değerinin hesaplanması için;

$Y=100/(1+10^{((\text{LogEC50}-X)*\text{HillSlope}))})$ eşitliği kullanılmıştır.

4.2.7. EC50 DEĞERİNİN BELİRLENMESİ VE USNIK ASİT KONSANTRASYONLARININ UYGULANMASI

CaCo2, HepG2, Hep2C, RD, Wehi, L929 ve Vero hücreleri T-25 flasklar içerisinde çoğaltılmıştır. Hücre yoğunluğu her bir hücre flaksı için 1×10^6 olarak optimize edilmiştir. Optimize edilen sayıya varan hücrelerin RNA izolasyonun kolaylıkla yapılabilmesi için petri plate'e alınmıştır ve EC50 (Half Maximal Effective Concentration) değeri belirlenmiş usnik asit uygulaması yapılmıştır. Her bir kanser ve normal hücre hattı için iki adet biyolojik tekrar

kullanılmıştır. Ayrıca usnik asit liken sekonder metabolitinin çözücüsü olan DMSO ve MEM ile de tüm hücreler muamele edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. EC50 konsantrasyonuna göre Usnik Asit Uygulaması.

4.2.8. TOTAL RNA İZOLASYONU, MİKTAR VE KALİTE TAYİNİ

Öncelikle RNA kolaylıkla bozulabilen bir molekül olması nedeniyle sürekli buz üzerinde çalışılmıştır. RNA izolasyonu için hazır hale getirilen hücreler soğuk PBS ile çift tekrarlı olarak yıkandıktan sonra swap ile kazanmış ve PBS ile birlikte tüplere aktarılıp santrifüj edilerek bir araya getirilmiştir. Bir araya toplanmış tüp içerisindeki hücre pelletleri üzerine 1ml TRizol (Genezol) eklenir ve pellet enjektörden geçirilir ve sürekli pipetaj yapılarak hücrelerin çözünmesi sağlanır. 1.5 ml'lik ependorf tüpüne alınan hücrelere 200 µl kloroform (MERCK) eklenir çalkalanır ve 3 dk oda sıcaklığında bekletilir. 14.000 rpm 4°C'de 25 dakika boyunca santrifüj yapılır. En üstde yer alan faz dikkatlice yeni bir tüpe aktarılmıştır ve 500µl izopropanol eklenip pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 10dk bekletildikten sonra 14.000 rpm 4°C'de 25 dakika santrifüj edilip pellet üzerinde kalan izopropanol pipetle dikkatlice çekilip atılmıştır. Pellet üzerine 1ml %70 Etanol (MERCK) eklenerek 10.000rpm 4°C'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Etanol işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır. Peletler 25 µl otoklavlı su ile sulandırılıp pipetaj yapılmış ve hemen buz üzerine alınmıştır. RNA örnekleri 2 µl su ile sulandırılarak kullanılmış ve Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) kullanılarak saflık ve konsantrasyonunun belirlenmesi sağlanmıştır. Ayrıca rastgele seçilen bazı örneklerde 2xAgaroz jel hazırlanıp Syngene Gene Genius Bio Imaging Sistem marka UV görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir. Örnekler -80 °C'de saklanmıştır.

4.2.9. cDNA (KOMPLEMENTER DNA) SENTEZİ

cDNA sentezi, Rosche First Strand cDNA Synthesis Kit (Rosche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TP53, Bcl2, Bax ve GAPDH gen bölgeleri anchored-oligo(dT)₁₈ ile

çalışılmıştır. Çizelge 4.3’de cDNA sentezinin ilk aşamasında hazırlanan total RNA ve primer karışımı içerisinde bulunan bileşenler ve son konsantrasyonları verilmiştir.

1. Çizelge 4.3’de yer alan bileşenler buz üzerinde tutulan nükleaz free tüpe sırasıyla eklenir.

Çizelge 4.3. Total RNA ve primer konsantrasyonu

Komponent	Final Konsantrasyon
Total RNA	0.1 ng – 5 µg total RNA
Anchored-oligo(dT)18 Primer, 100 pmol/µl	1 µL
Saf su	Toplam hacim 13 µl’ye ayarlanır

2. Total RNA–primer karışımı ısı döngü cihazında, 65 °C’de 5 dakika bekletilerek RNA’nın ikincil yapısının denatürasyonu sağlanır.
3. Isı döngü cihazından çıkan örnekler kırık buza saplanıp 5 dakika bekletilir.
4. Ters transkripsiyon reaksiyonunun (RT-PCR) gerçekleştirilmesi için Çizelge 4.4’de yer alan bileşenler sırasıyla eklenir.

Çizelge 4.4. Ters Transkripsiyon (RT-PCR) Reaksiyonu Komponentleri

Komponent	Miktar
5x Reaksiyon tamponu	4 µL
RiboLock RNase İnhibitör (20 U/µL)	0,5 µL
10 mM dNTP karışımı	2 µL
RevertAid H Minus M- MuL V Ters Transkriptaz (200 U/ µL)	0,5 µL
Toplam hacim	20 µL

5. Pipetle hafifçe karıştırılıp, santrifüj edilir.
6. Ters transkripsiyon reaksiyonu Çizelge 4.5’da belirtilen programda, ısı döngü cihazında gerçekleştirilir.

Çizelge 4.5. Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program

Primer	Hedef mRNA	RT Reaksiyonu İnkübasyon Süresi
Oligo(dT) ₁₈ primer	4 kb’a kadar	55 °C’de 30 dk
		85 °C’de 5 dk

7. Elde edilen cDNA’lar Real time PCR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

4.2.10. PRİMER DİZAYNI

Çalışmada housekeeping gen olarak kullanılan GAPDH ve hedef gen bölgesine ait olan TP53, Bcl-2 ve Bax primerlerinin sentezi, gen bankasında (NCBI) yer alan dizilerden hedef hücre hattı orijinal kaynağına en yakın homolojiyi gösterenler kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen primerler için erime eğrisi (Melting curve) analizi yapılmış ve primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hatalar gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri

(F: Forward/İleri, R: Reverse/Geri)

Primer	Sekans (5'→3')	Primer uzunluğu (bç)	Bağlanma Sıcaklığı (T _m)
TP53	Forward: 5'-AACGGTACTCCGCCACC-3' Reverse: 5'-CGTGTCACCGTCGTGGA-3'	94	60.0 °C
Bcl-2	Forward: 5'-CTGCACCTGACGCCCTTCACC-3' Reverse: 5'-CACATGACCCCACCGAACTCAAAGA-3'	119	65.0 °C
Bax	Forward: 5'-TCCCCCGAGAGGTCTTTT-3' Reverse: 5'-CGGCCCCAGTTGAAGTTG-3'	68	65.0 °C
GAPDH	Forward: 5'-AACGGGAAGCTTGTCATCAATGGAAA-3' Reverse: 5'-GCATCAGCAGAGGGGGCAGAG-3'	194	60.0 °C

4.2.11. GEN İFADESİNİN REAL-TİME PCR İLE BELİRLENMESİ

Real-Time PCR uygulaması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda Roche Light Cycler 480 Real Time cihazı aracılığıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışılması hedeflenen genlere ait diziler NCBI veritabanında araştırılıp çıkarılmış ve bölgeye özgü primerler tasarlanarak sentezletirilmiştir. Ayrıca ekspresyon çalışmaları için gerekli şartlardan birisi olan normalizasyon işleminde bir housekeeping (referans) gen olan GAPDH geni kullanılmıştır. Real-Time PCR yöntemi ile kantitasyon (miktar belirleme=gen ekspresyonu miktarı belirleme) çalışması SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kantitasyonu takiben PCR'in etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla Erime Eğrisi (Melting curve) Analizi yapılmıştır. Kontrol grubu ile TP53, Bcl-2 ve Bax gen bölgesi için tasarlanan bütün primerlerin, Real time PCR

reaksiyonları denenerak optimizasyonu sağlanmıştır. En iyi sonucu veren TP53, Bcl-2 ve Bax primeleri ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol rnekleri ile gerçekleştirilen primer optimizasyonu çalışmaları sonrasında bütün örneklerin Real time PCR reaksiyonu yapılmıştır. Usnik asit uygulamaları sonrasında seçilen örneklerin Real Time PCR reaksiyonları üç tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR reaksiyonu izelge 4.7’de verilen komponentler ile hazırlanmış olup saf su ile toplam hacim 20 μ l’ye ayarlanarak Roche Light Cyler 480 Real-Time cihazında izelge 4.8’de verilen programda çoğaltılmıştır.

Çizelge 4.7. Real Time PCR komponentleri

Komponent	Son Konsantrasyon
cDNA	1,5 μ l
İleri (Forward) Primer	0,7 μ l
Geri (Reverse) Primer	0,7 μ l
SYBR® Green Master Mix	10 μ l
Toplam hacim 20 μl’dir.	

Çizelge 4.8. Real Time PCR deney programı

Primer	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	10 s	1
Denatürasyon	95 °C	10 s	40
Bağlanma	60 °C	10 s	
	72 °C	8 s	
Erime	95 °C	30 s	1
Eğrisi Analizi	60 °C	30 s	
	99 °C sürekli okuma		

GAPDH, TP53, Bcl-2 ve Bax genlerinin usnik asit uygulaması sonrasında alınmış örneklerin Real-Time PCR reaksiyonu Roche Light Cycler 480 Real Time cihazında, Relative Standard Curve'de gerçekleştirilmiş ve gerçek zamanlı olarak izlenerek pik profilleri kaydedilmiştir. Cycle Treshold (Ct) değeri polimeraz zincir reaksiyonuna ait pik profilinde logaritmik artışa geçilen ilk noktayı belirtmektedir. Real time PCR reaksiyonları sonrasında elde edilen pik profillerinden her bir örneğe ait Ct değerleri belirlenmiştir.

4.2.12. NORMALİZASYON VE İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR

Usnik asit uygulanan örneklerden de üçer tekrarlı olacak şekilde Real-Time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Usnik asit uygulanmış hücrelere ait transkript profilleri kontrol profilleri ve housekeeping gen olarak seçilen GAPDH ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna ve One Way ANOVA (Dunnett) ile yapılmıştır (120).

4.2.13. VERİ ANALİZİ

qRT-PCR analizi sonrası ham Cp (crossing point) değerleri olarak elde edilmiş ve $\Delta\Delta Ct$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir gen ifade seviyesi referans genlerin (GAPDH) ifadeleri ile normalize edilerek hesaplanmış daha sonra hücre hatlarındaki her bir gen değişimi birbirleri ile kıyaslanmıştır. Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı (SPSS 15) ile hesaplanmıştır.

RNA kalitesi ve $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{örnek 2}) - \Delta CT (\text{örnek 1})$ formülü ile herbir RNA için $\Delta\Delta CT$ değerleri hesaplanır.

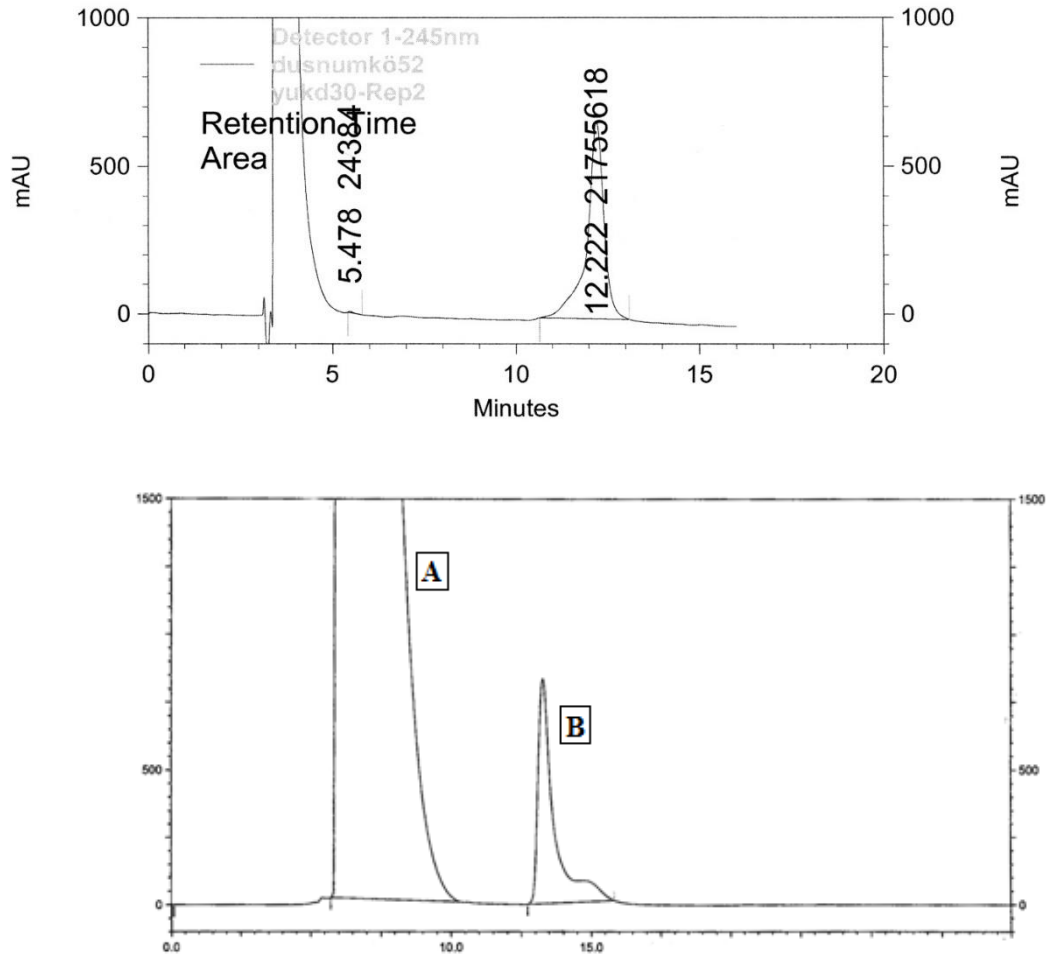
Son olarak her bir gen için $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ile kat değişimleri hesaplanır.



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DOĞAL USNİK ASİT'İN İZOLASYONU VE HPLC YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Tür teşhisi yapılan *Usnea diffracta* liken türünün aseton ekstresindeki usnik asit miktarı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmiştir. Usnik asitin kromotogramdaki piklerinin tanımlanması standart usnik asit ile alıkonma sürelerinin karşılaştırılması ile yapılmıştır. Şekil 5.1'de *Usnea diffracta* 'den izole edilen usnik asitin kromotogramı, aseton ekstratlarından elde edilen usnik asit miktarı ve alıkonma süreleri verilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *Usnea diffracta* liken türünden izole edilen usnik asit'in HPLC ile analizi. (A) solvent (tR: 5.4 dk); (B) usnik asit (tR: 13.1 dk).

5.2. DOĞAL VE TİCARİ USNİK ASİT'İN MTT TESTİ SONUÇLARI

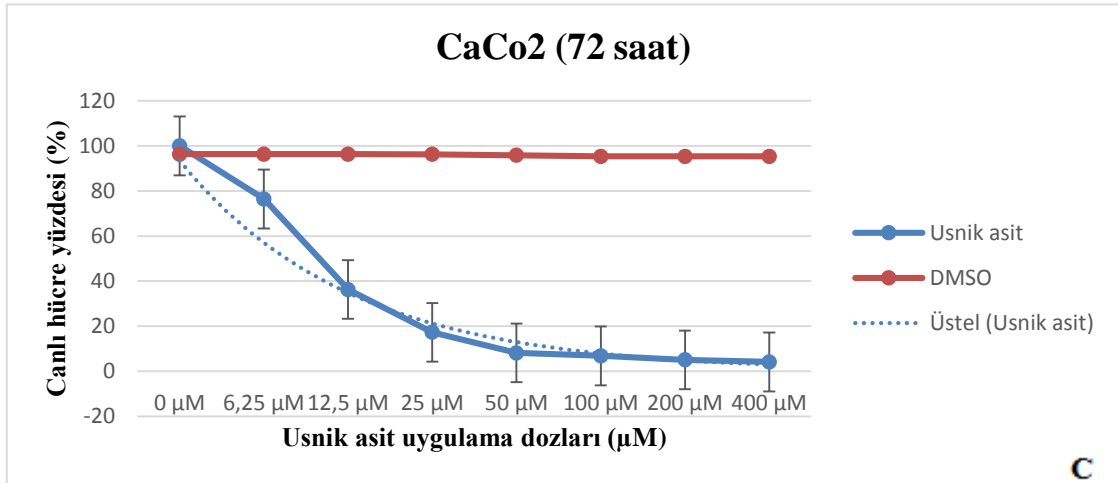
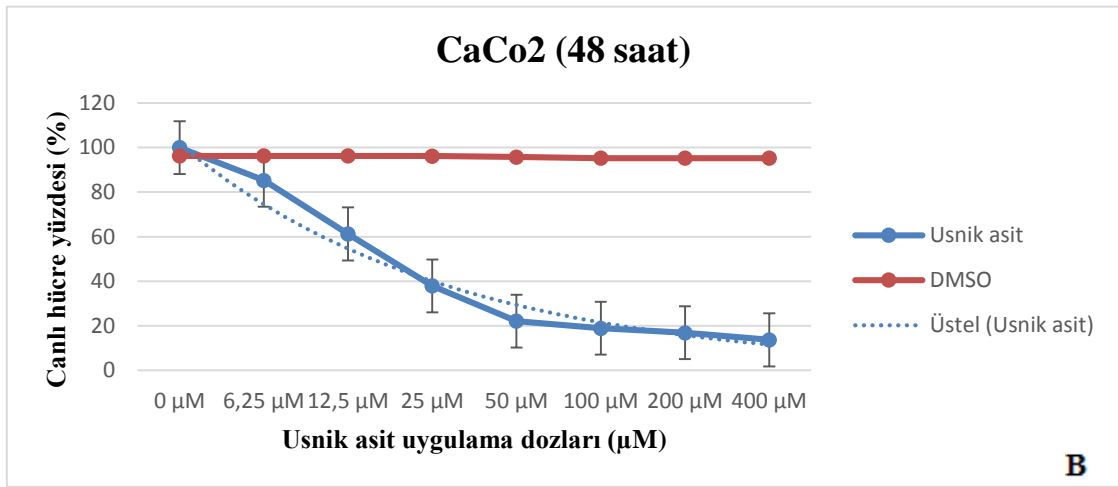
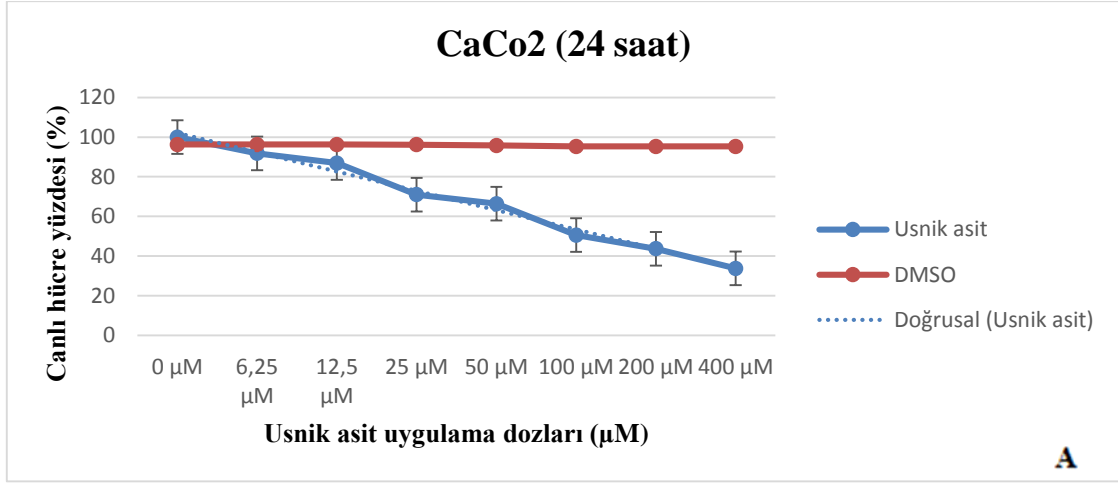
Araştırma sonucu elde ettiğimiz saf ve ticari usnik asit MTT testi sonucu elde edilen % proliferasyon değerleri topluca Çizelge 5.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1.Saf ve ticari usnik asit uygulaması sonrası hücre canlılığı (%) ortalama sonuçları (*UA: Usnik Asit).

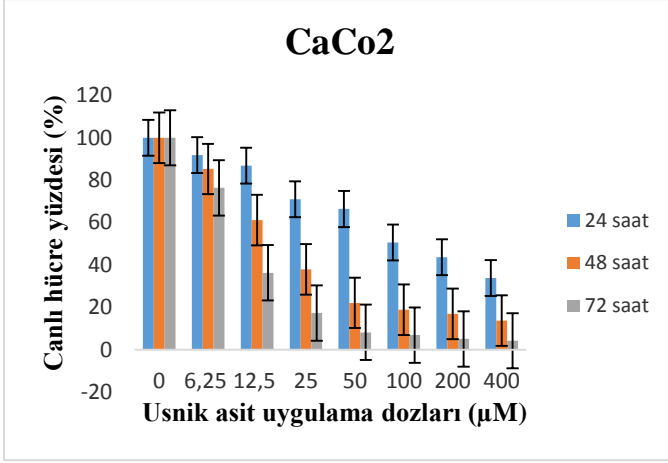
UA* uygulama süresi/dozu	KANSER HÜCRE HATTI										NORMAL HÜCRE HATTI			
	Doğal UA	Ticari UA	Doğal UA	Ticari UA	Doğal UA	Ticari UA	Doğal UA	Ticari UA	Doğal UA	Ticari UA	Doğal UA	Ticari UA	Doğal UA	Ticari UA
0 µM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6,25 µM	91.8	92.3	96.4	97.2	96.4	96.8	97.9	98	92.8	93.7	95	96.1	95.1	95.9
12,5 µM	86.9	87.2	87.3	88.4	90.8	91.9	77.2	78	81.3	82.8	92.7	94	89.4	91.2
24 Saat 25 µM	71	72.2	81.4	82.4	84.7	85.8	72.8	73.9	74.7	75.9	90.3	91	88	89.1
50 µM	66.4	67.2	82.7	83.9	66.2	68.4	59.6	60.7	53.1	55.4	88.1	89.4	87.3	88.2
100 µM	50.6	51.3	75.3	76.7	52.7	53.7	56.8	57.5	47	48.3	85.2	86.4	86.2	87.3
200 µM	43.7	44.9	46.4	47.2	52.3	53.9	50.7	51.3	44.6	35.6	84.1	85.2	86	87.2
400 µM	33.8	34.1	41.3	42.6	47.9	49.7	50.2	51	43.2	23.9	83.7	85	85.4	86.7
0 µM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6,25 µM	85.3	87.8	93.1	94.5	87.5	88.6	68.7	69.4	81.2	82.1	95.8	96.3	97.3	98.6
12,5 µM	61.2	61.4	89.3	90.6	86.2	87.6	41	42.1	60.9	61.2	98.6	99.1	92.3	93.5
48 Saat 25 µM	37.9	38.9	89.3	89.9	58.6	59.2	30.9	31.8	32.2	32.8	92.7	94	91.9	93
50 µM	22.1	23.2	80.7	81	51.4	52.5	21.2	22.4	33.1	33.9	90.6	91.8	89.4	90.6
100 µM	18.9	20.3	31.2	32	4.9	5.1	19	19.3	28.9	29.7	86.2	87.5	85.6	86.9
200 µM	16.9	17	26.1	27	2.4	2.5	4.8	4.9	16.5	16.7	85.9	87.1	84.5	85.7
400 µM	13.7	15.1	21.9	23.1	2.3	2.4	1.1	1.3	13.3	14.6	83.7	84.9	82.3	83.6
0 µM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6,25 µM	76.4	78.8	96.2	98.5	85.4	86.6	42.3	43.2	53.2	54.9	86.3	87.8	87.2	89.4
12,5 µM	36.3	37.3	87	89.2	55	56.1	21	21.5	48.3	49.6	87.3	88.5	84.3	85.8
72 Saat 25 µM	17.3	18.3	58	58.4	40.9	41.4	14.9	15.1	29.6	30.1	85.9	87.2	82.7	84
50 µM	8.2	8.8	33.1	33.3	2.8	2.9	11.2	11.5	22	23.4	84.5	85.8	81.9	83.1
100 µM	6.9	7.1	9.6	10	1.1	1.4	7.9	8.1	16.4	17.9	83.1	84.5	81	82.4
200 µM	5.1	5.5	7.8	8.4	1.2	1.4	1.5	1.5	2.9	3	82.4	83.7	80.4	81.6
400 µM	4.2	5	5.1	5.6	1.2	1.2	1.2	1.2	2.1	2.1	81.7	82.9	80.1	81.2

5.3. DOĞAL USNİK ASİT UYGULAMASI SONUCU MTT HÜCRE CANLILIĞI YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Doğal usnik asit konsantrasyonu olarak 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 µM dozları kullanılmıştır. CaCo2, HepG2, Hep2C, RD, Wehi, L929 ve Vero hücre hatları için 24, 48 ve 72 saat doğal usnik asit uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre grafikler Şekil 5.2-Şekil 5.15 arasında verilmiştir.



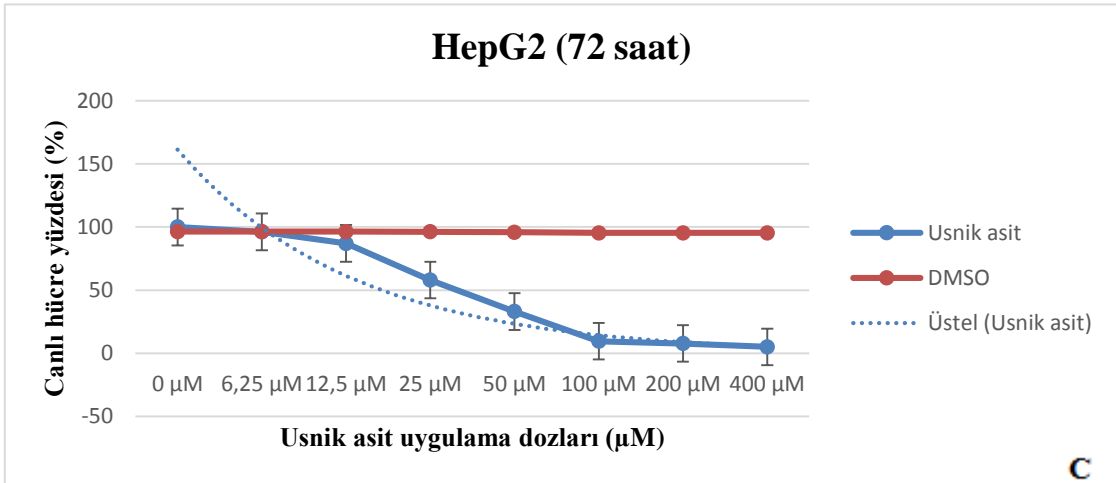
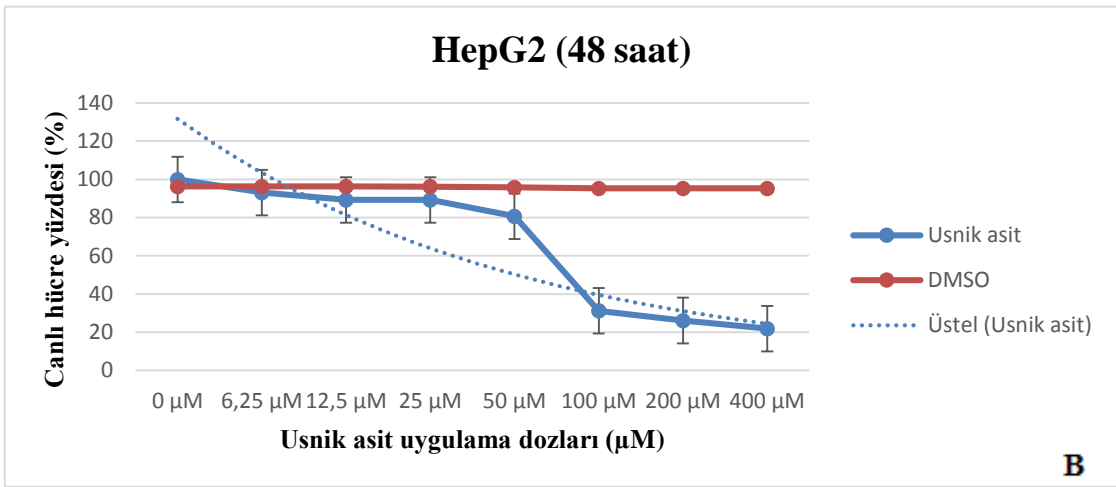
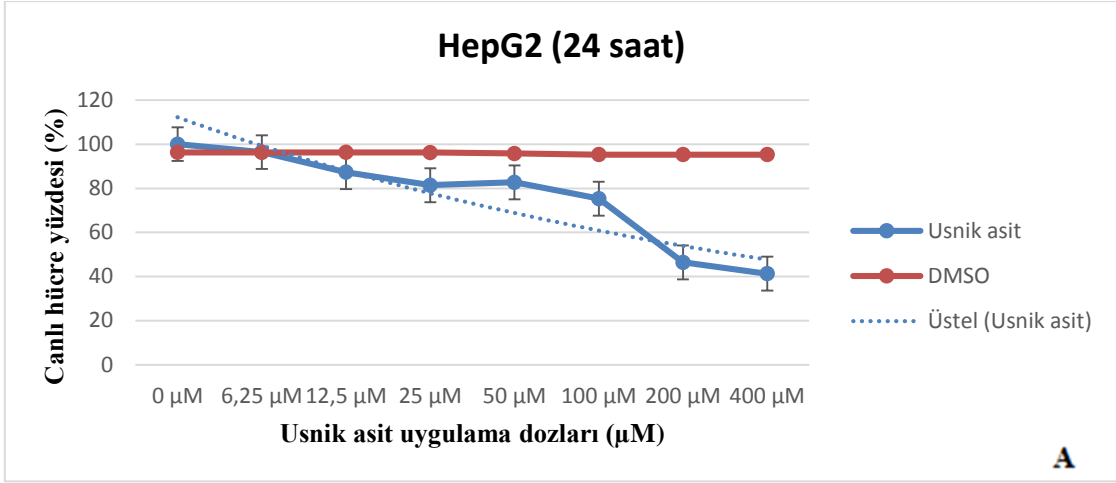
Şekil 5.2. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş CaCo2 hücreleri



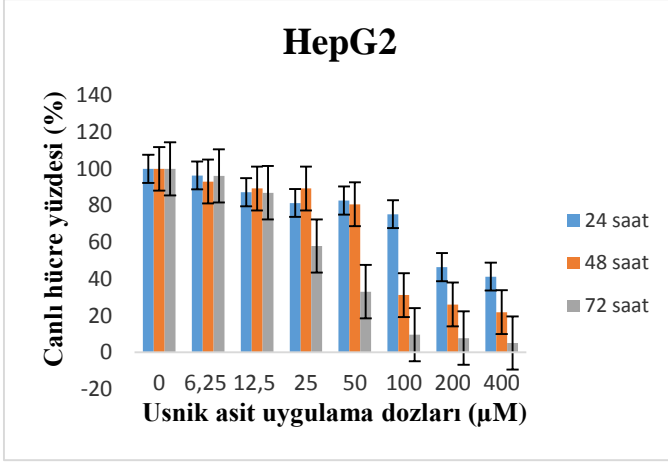
Uznik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	91.8	85.3	76.4
12,5 µM	86.9	61.2	36.3
25 µM	71.0	37.9	17.3
50 µM	66.4	22.1	8.2
100 µM	50.6	18.9	6.9
200 µM	43.7	16.9	5.1
400 µM	33.8	13.7	4.2

Şekil 5.3. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş CaCo2 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri

Şekil 5.2 ve Şekil 5.3’de görüldüğü gibi doğal usnik asit’in 48 saat 25 µM uygulaması CaCo2 hücre hattı üzerine hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir. Daha uzun süre olan 72 saat usnik asit uygulamasında ise 12.5 µM UA konsantrasyonunda yüksek oranda hücre canlılığını azaltıcı etki görülmüştür.



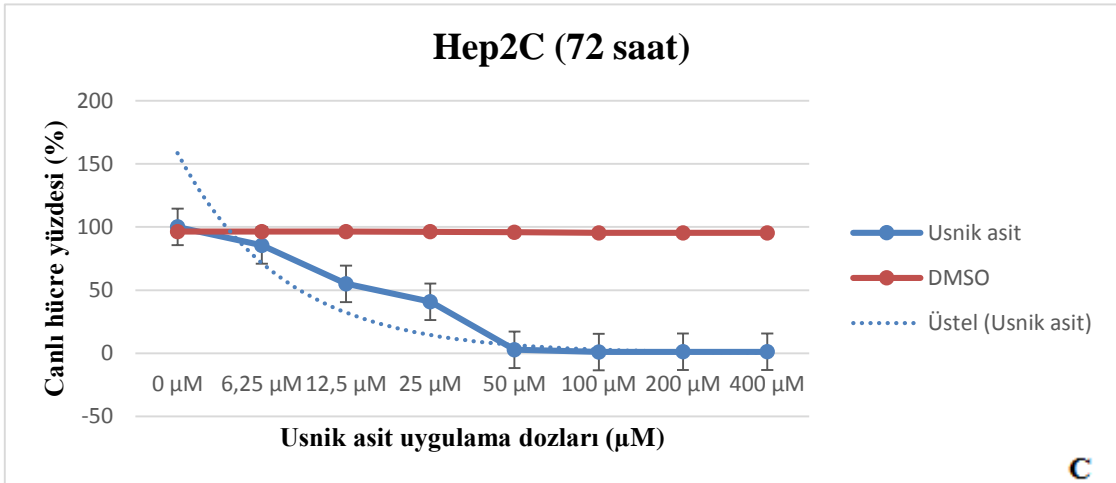
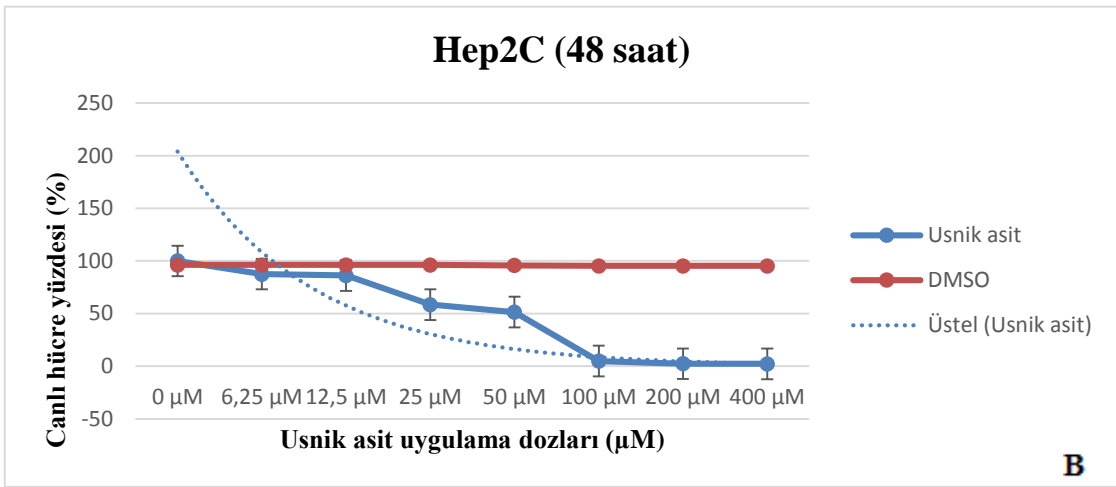
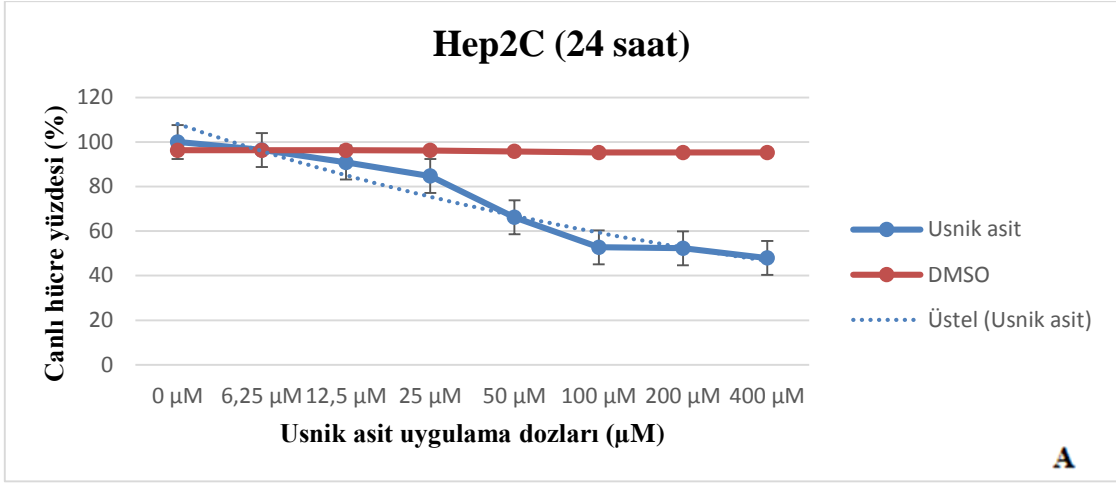
Şekil 5.4. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş HepG2 hücreleri



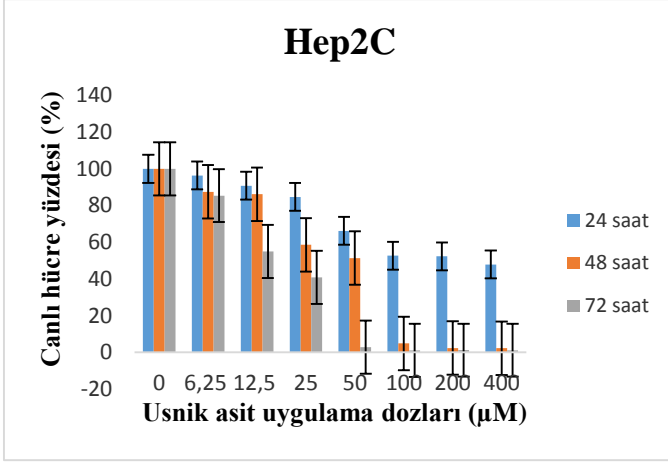
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	96.4	93.1	96.2
12,5 µM	87.3	89.3	87.0
25 µM	81.4	89.3	58.0
50 µM	82.7	80.7	33.1
100 µM	75.3	31.2	9.6
200 µM	46.4	26.1	7.8
400 µM	41.3	21.9	5.1

Şekil 5.5. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş HepG2 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri

Şekil 5.4 ve Şekil 5.5'te görüldüğü gibi HepG2 hücre hattı üzerine doğal usnik asit her üç saat uygulaması sonucunda 24 saat'de 200 µM UA konsantrasyonunda %46'ya kadar; 48 saat'de 100 µM UA konsantrasyonunda %31'e kadar; 72 saat 50 µM UA konsantrasyonunda %33'e kadar düşen hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir. HepG2 hücreleri için 48 saat ve 72 saat sonucunda da hücre canlılığında yaklaşık %30'lara kadar bir azalma gözlemlenmiştir.



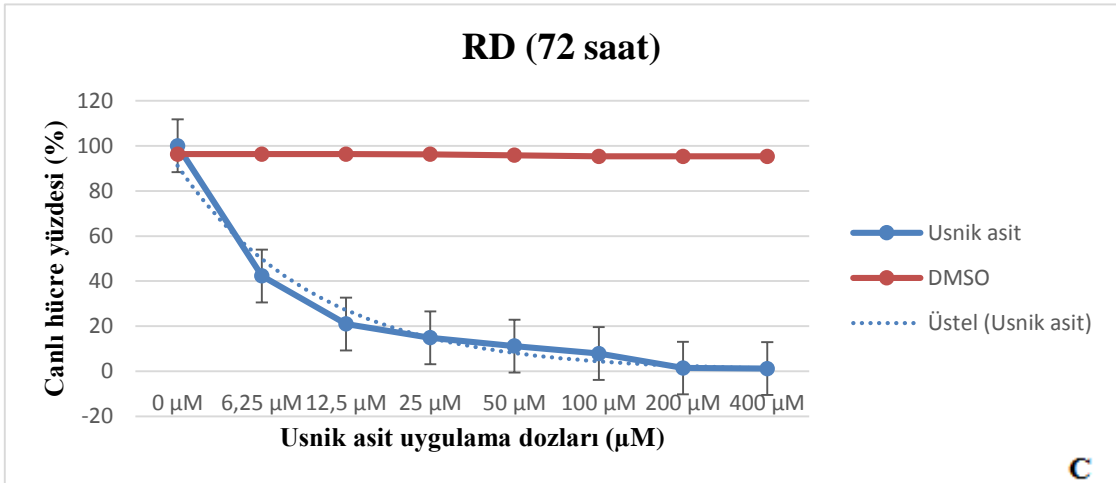
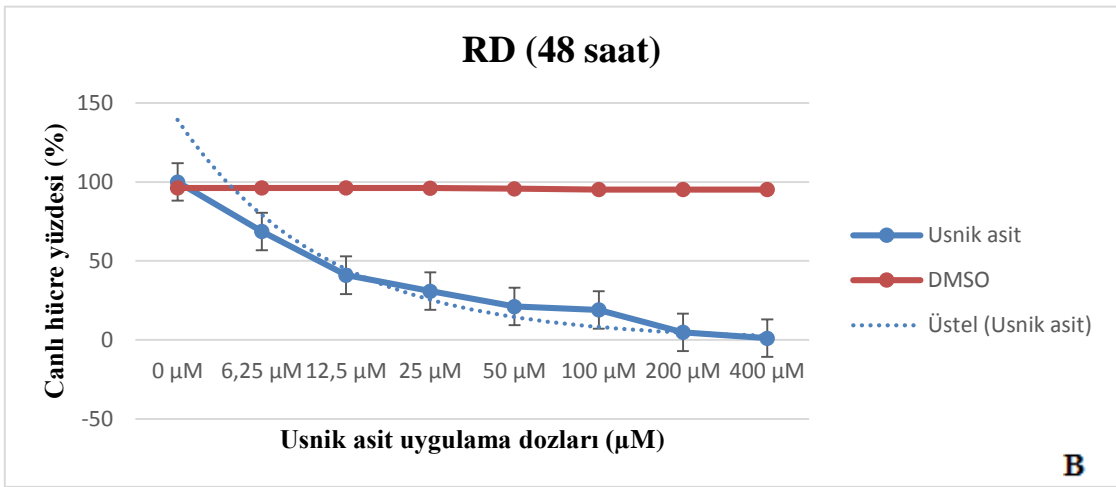
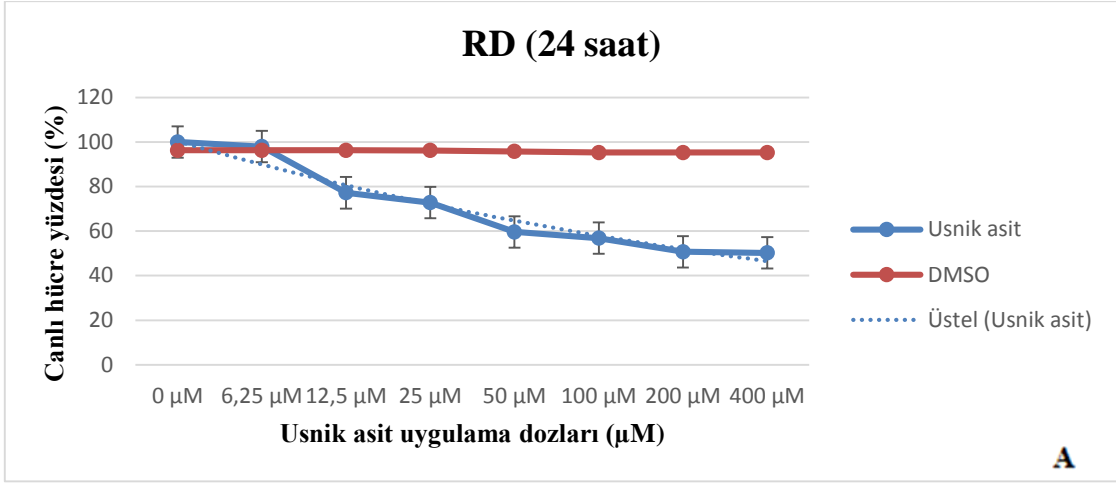
Şekil 5.6. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş Hep2C hücreleri



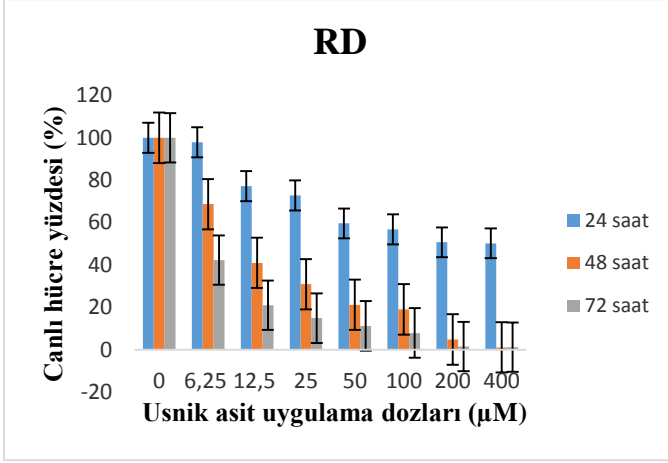
Ursik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	96.4	87.5	85.4
12,5 µM	90.8	86.2	55.0
25 µM	84.7	58.6	40.9
50 µM	66.2	51.4	2.8
100 µM	52.7	4.9	1.1
200 µM	52.3	2.4	1.2
400 µM	47.9	2.3	1.2

Şekil 5.7. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş Hep2C hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri

Şekil 5.6 ve Şekil 5.7’de görüldüğü gibi Hep2C hücre hattı üzerine doğal usnik asit’in özellikle 48 saat ve 72 saatlik uygulamalarında doğal usnik asit’in konsantrasyondaki artışa bağlı olarak (100 µM’dan 400 µM’a kadar) canlı hücre yüzdesinde azalma meydana gelmiştir. 48 saat içinde 100 µM UA konsantrasyonunda yaklaşık %5’e kadar 72 saat içinde yine 50 µM UA konsantrasyonunda yaklaşık %3 kadar hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir.



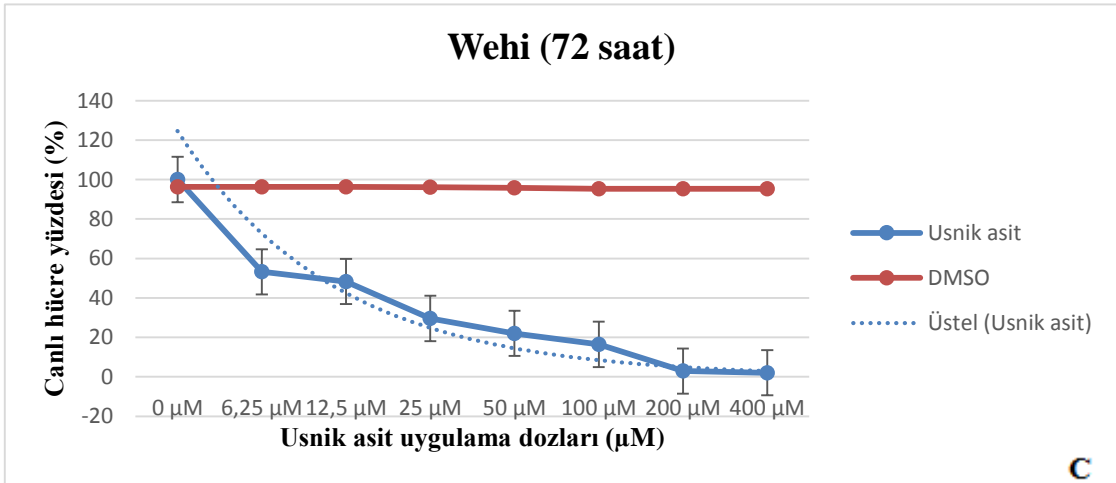
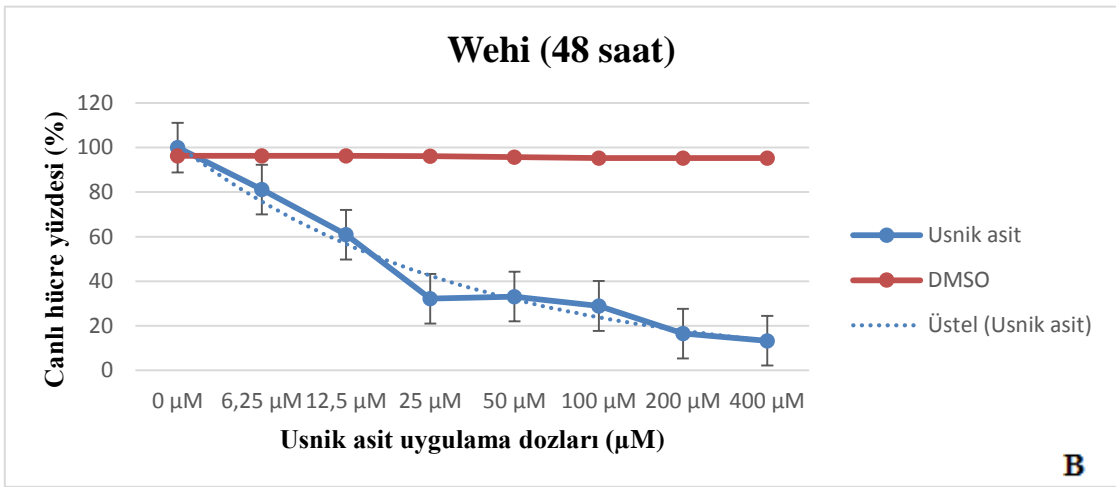
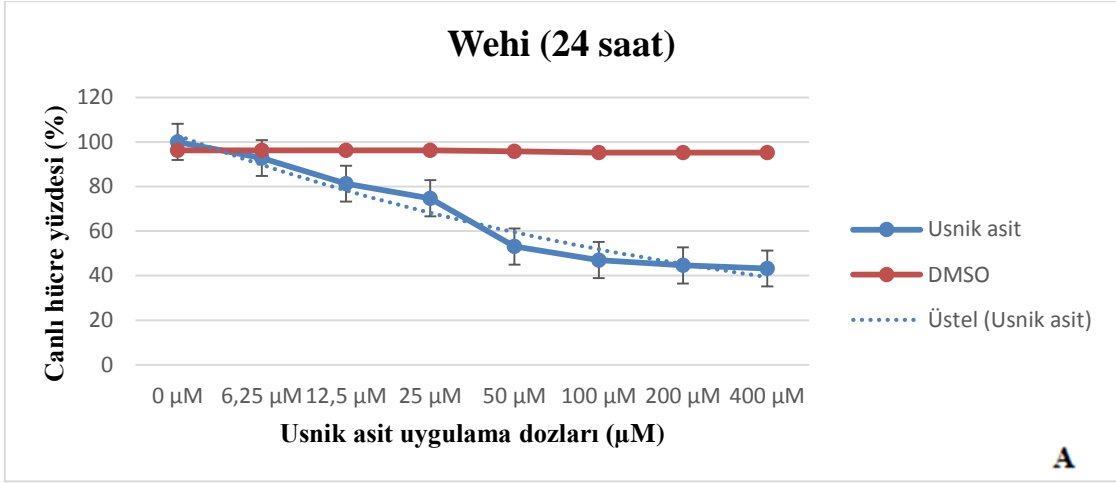
Şekil 5.8. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş RD hücreleri



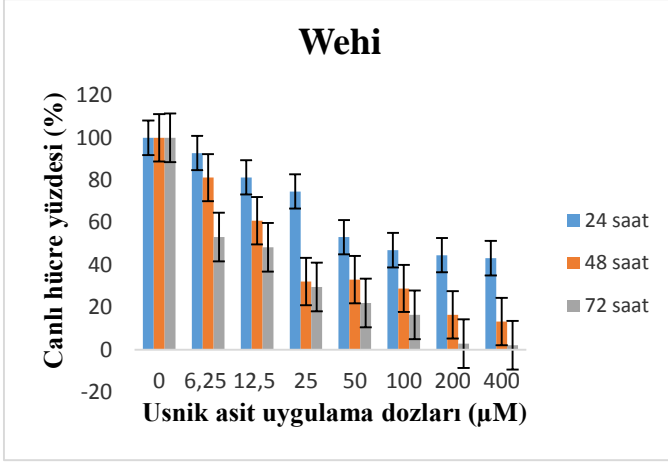
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	97.9	68.7	42.3
12,5 µM	77.2	41.0	21.0
25 µM	72.8	30.9	14.9
50 µM	59.6	21.2	11.2
100 µM	56.8	19.0	7.9
200 µM	50.7	4.8	1.5
400 µM	50.2	1.1	1.2

Şekil 5.9. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş RD hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri

Şekil 5.8 ve Şekil 5.9’de görüldüğü gibi doğal usnik asit’in zamana ve konsantrasyona bağlı olarak RD hücre hattı üzerine önemli oranda hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir. Özellikle doğal usnik asit’in 6.25 µM konsantrasyonda 48 saat ve 72 saatlik uygulamalarında RD canlı hücre yüzdesi sırasıyla %68.7 ve %42.3’e kadar azalmıştır.



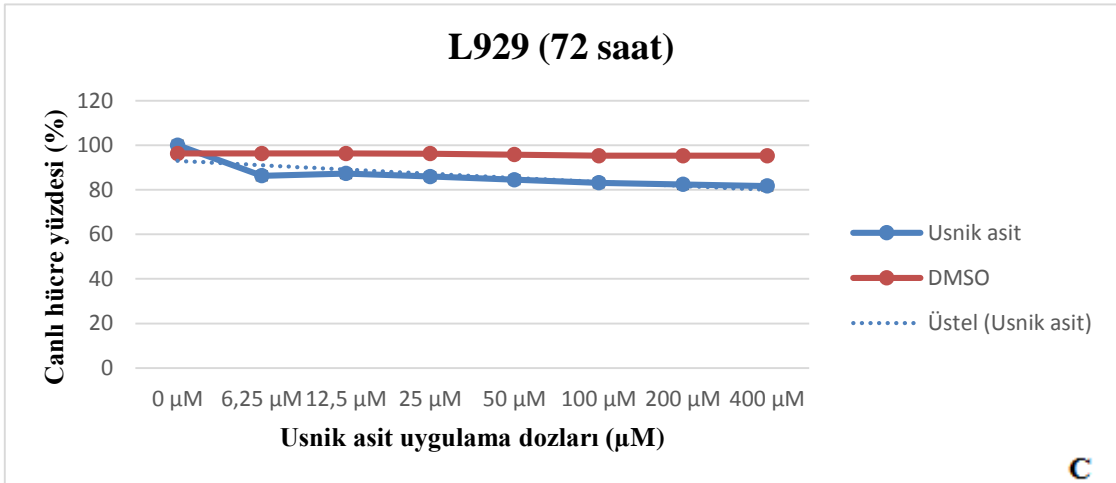
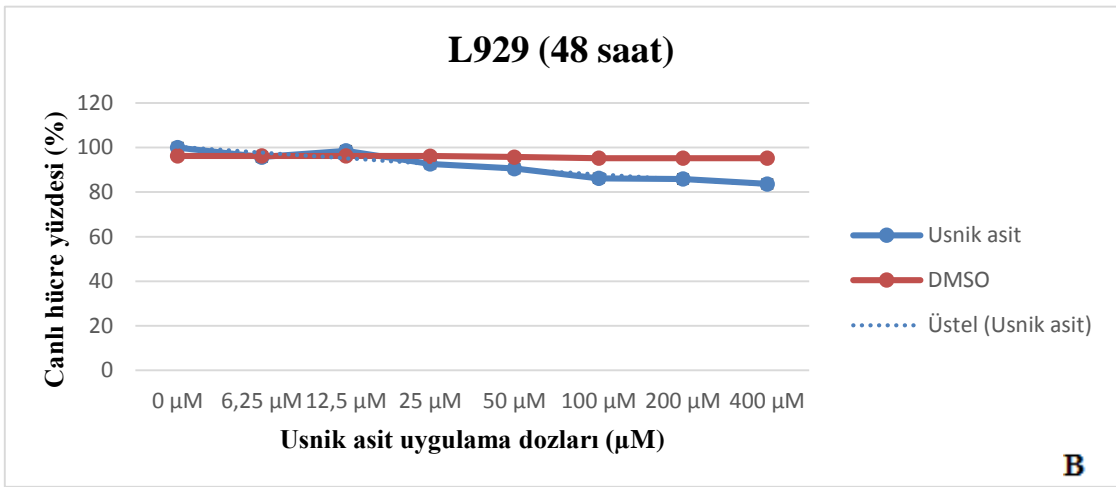
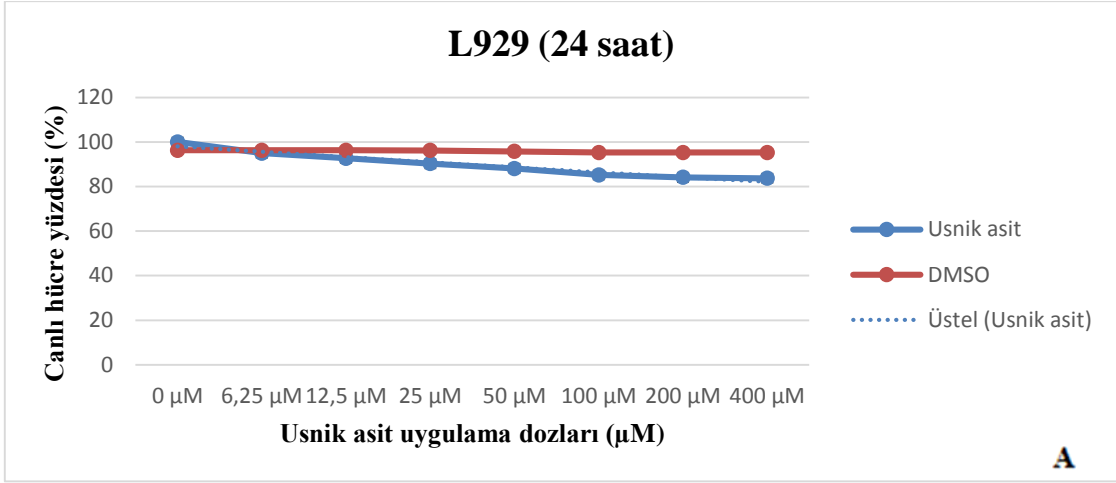
Şekil 5.10. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş Wehi hücreleri



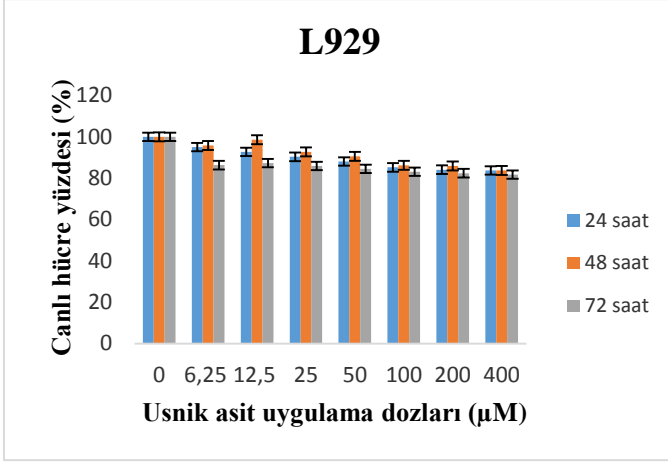
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	92.8	81.2	53.2
12,5 µM	81.3	60.9	48.3
25 µM	74.7	32.2	29.6
50 µM	53.1	33.1	22
100 µM	47.0	28.9	16.4
200 µM	44.6	16.5	2.9
400 µM	43.2	13.3	2.1

Şekil 5.11. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş Wehi hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri

Şekil 5.10 ve Şekil 5.11’de görüldüğü gibi 25 µM doğal usnik asit uygulaması 48 saat ve 72 saatlik uygulamaları sonucunda Wehi canlı hücre sayısında yaklaşık olarak %70’lik bir azalma meydana getirmiştir.



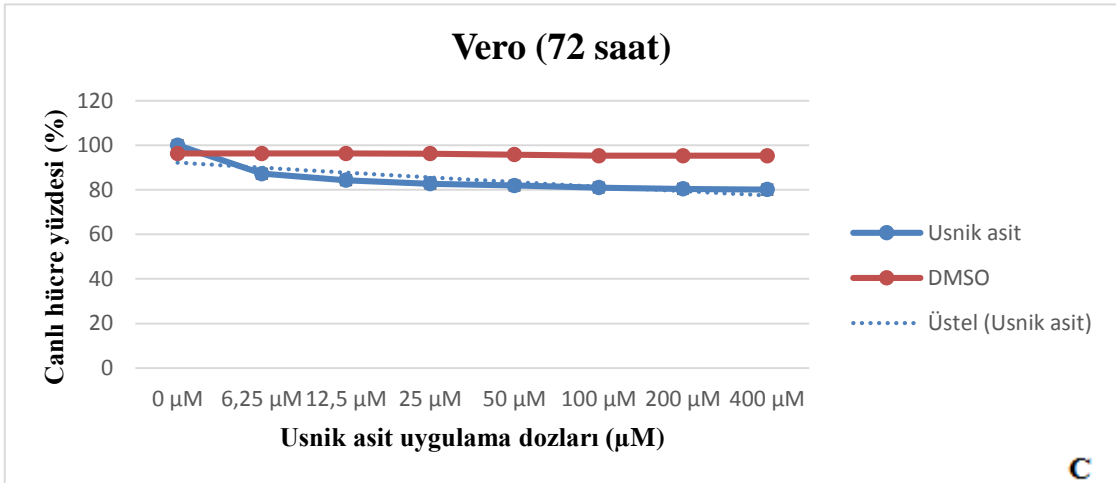
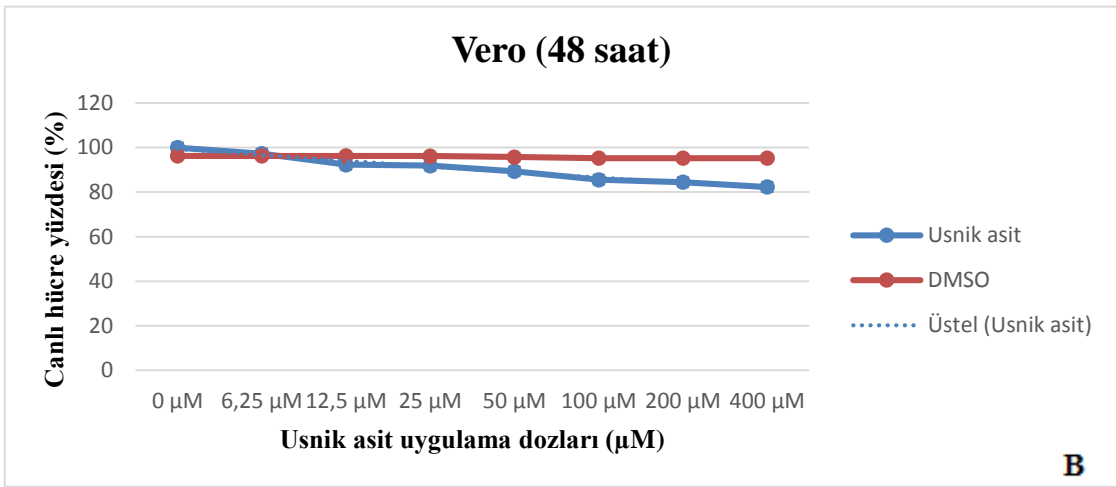
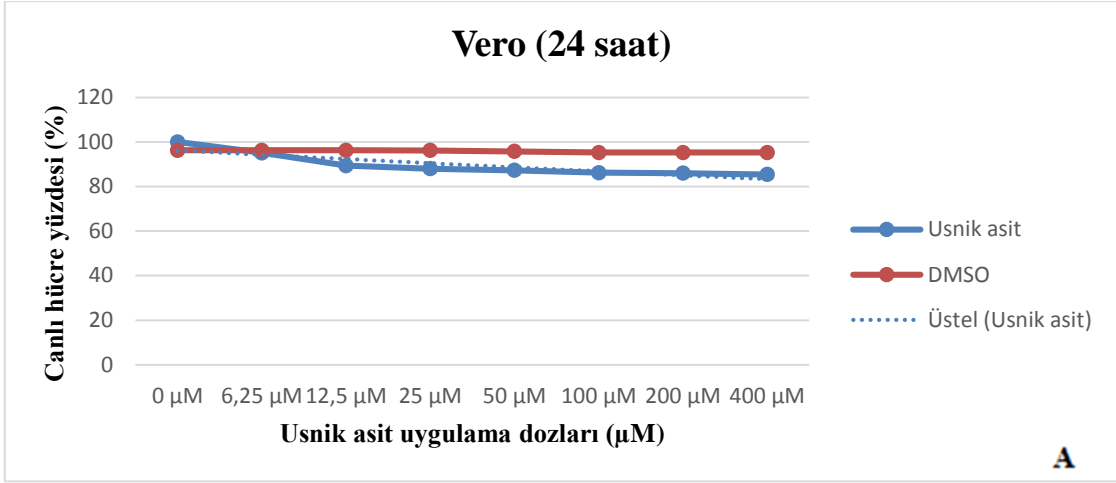
Şekil 5.12. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş L929 hücreleri



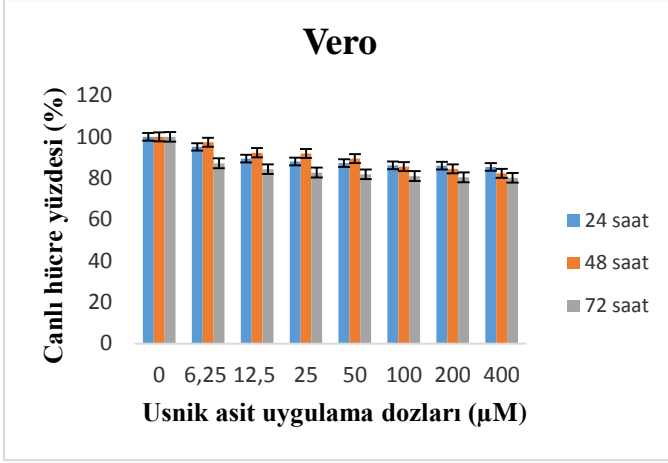
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	95.0	95.8	86.3
12,5 µM	92.7	98.6	87.3
25 µM	90.3	92.7	85.9
50 µM	88.1	90.6	84.5
100 µM	85.2	86.2	83.1
200 µM	84.1	85.9	82.4
400 µM	83.7	83.7	81.7

Şekil 5.13. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş L929 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri

Şekil 5.12 ve Şekil 5.13’de görüldüğü gibi L929 normal hücre hattı üzerine doğal usnik asit uygulaması canlı hücre yüzdesinde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak önemli bir azalma meydana getirmemiştir. Çalışmamızda kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 400 µM UA konsantrasyonunda tüm zaman (24-48-72 saat) denemelerinde bile % canlılığı sırasıyla %84, %84 ve %82’e ancak düşürebilmiştir. Bu durum canlı hücre sayısında yaklaşık %16 oranında azaltıcı etki gösterdiği sonucunu ortaya çıkarmıştır.



Şekil 5.14. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) doğal usnik asit ile muamele edilmiş Vero hücreleri



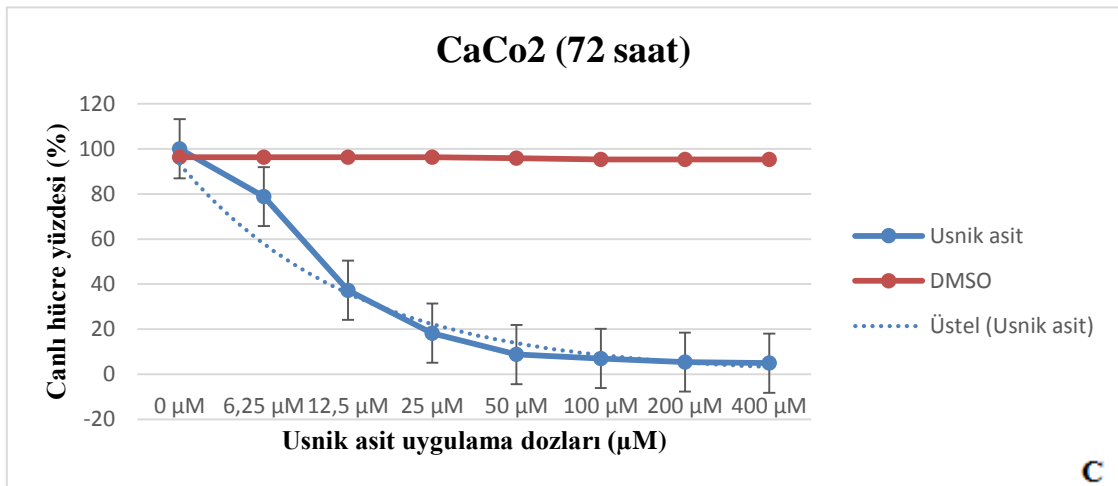
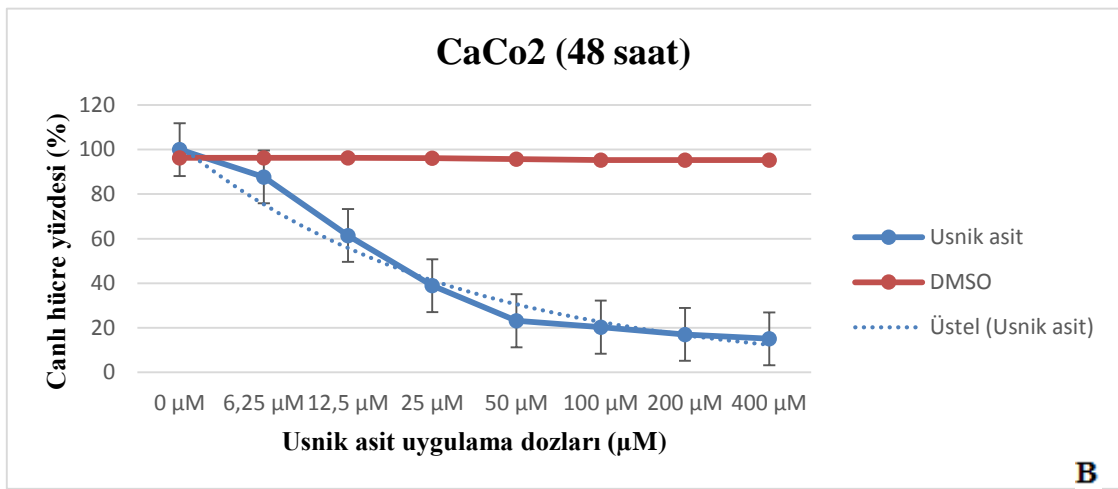
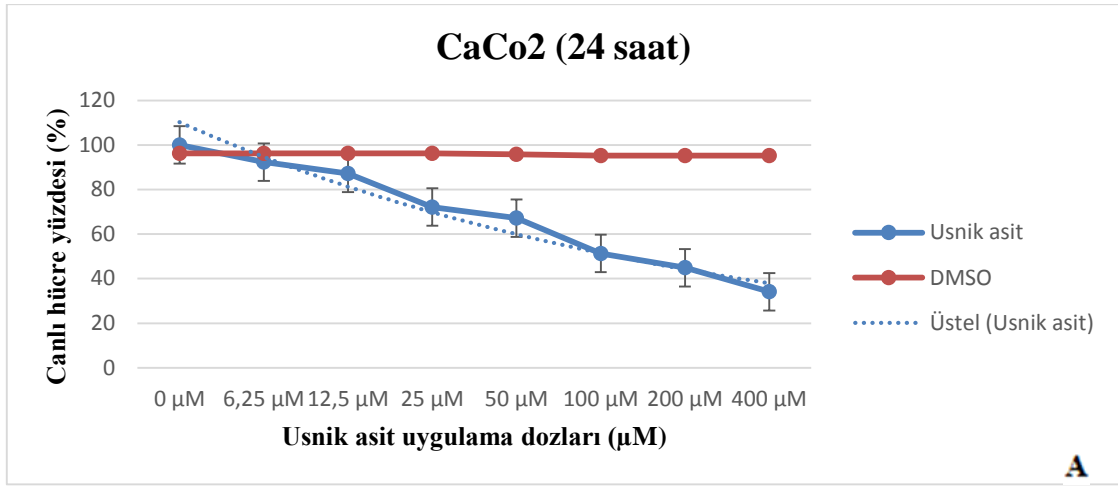
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	95.1	97.3	87.2
12,5 µM	89.4	92.3	84.3
25 µM	88.0	91.9	82.7
50 µM	87.3	89.4	81.9
100 µM	86.2	85.6	81.0
200 µM	86.0	84.5	80.4
400 µM	85.4	82.3	80.1

Şekil 5.15. 24 saat, 48 saat ve 72 saat doğal usnik asit ile muamele edilmiş Vero hücre grafiği ve canlı hücre yüzdeleri

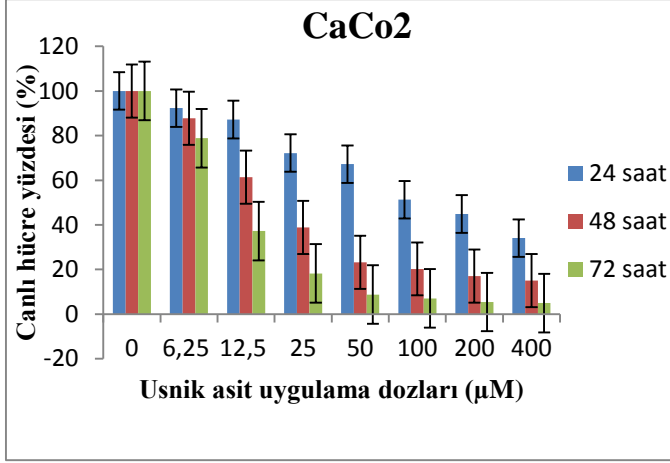
Şekil 5.14 ve Şekil 5.15'te görüldüğü gibi doğal usnik asitin artan konsantrasyonlarında ve üç farklı saat (24-48-72 saat) uygulamasında Vero normal hücre hattı üzerine önemli oranda hücre canlılığını azaltıcı bir etki göstermemiştir. L929 normal hücre hattında gözlemlendiği gibi Vero hücresi de % 100 canlılık oranını sırasıyla %85, %82 ve %80 oranına düşürmüştür. Yine L929 normal hücre hattına benzer olarak yaklaşık %20 oranında hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir.

5.4. TİCARİ USNİK ASİT UYGULAMASINA AİT SONUÇLAR

Ticari usnik asit konsantrasyonu olarak 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 µM dozları kullanılmıştır. CaCo2, HepG2, Hep2C, RD, Wehi, L929 ve Vero hücre hatları için 24, 48 ve 72 saat ticari usnik asit uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre grafikler Şekil 5.16-Şekil 5.29 arasında verilmiştir.



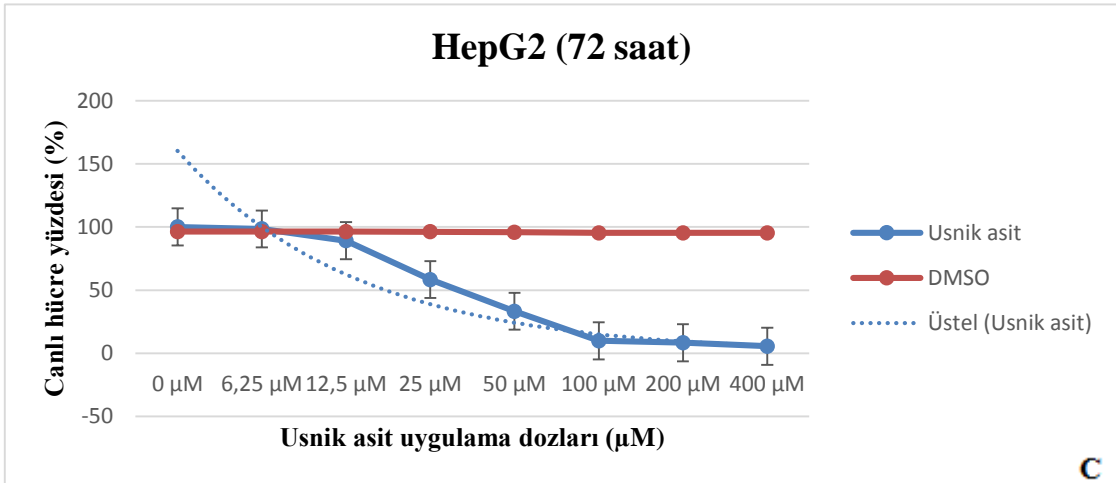
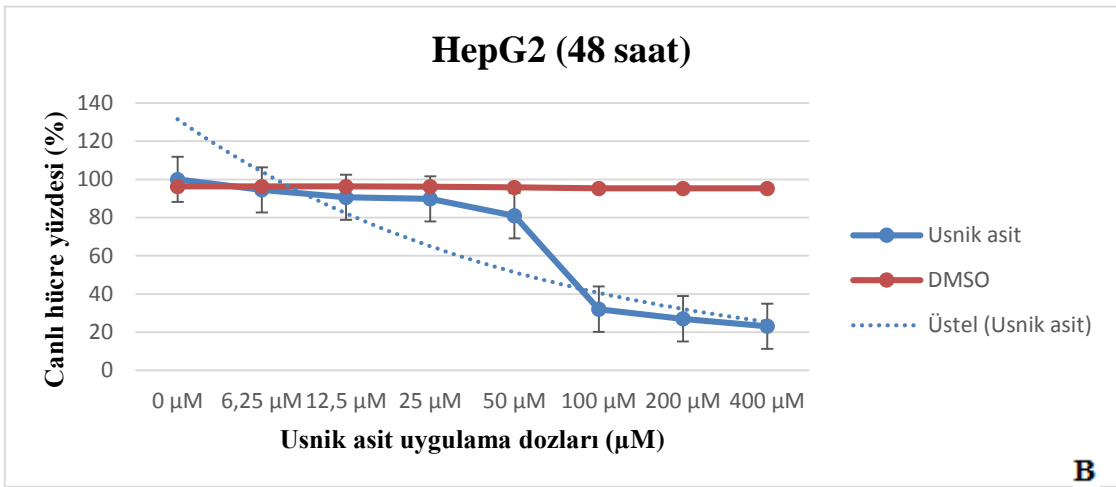
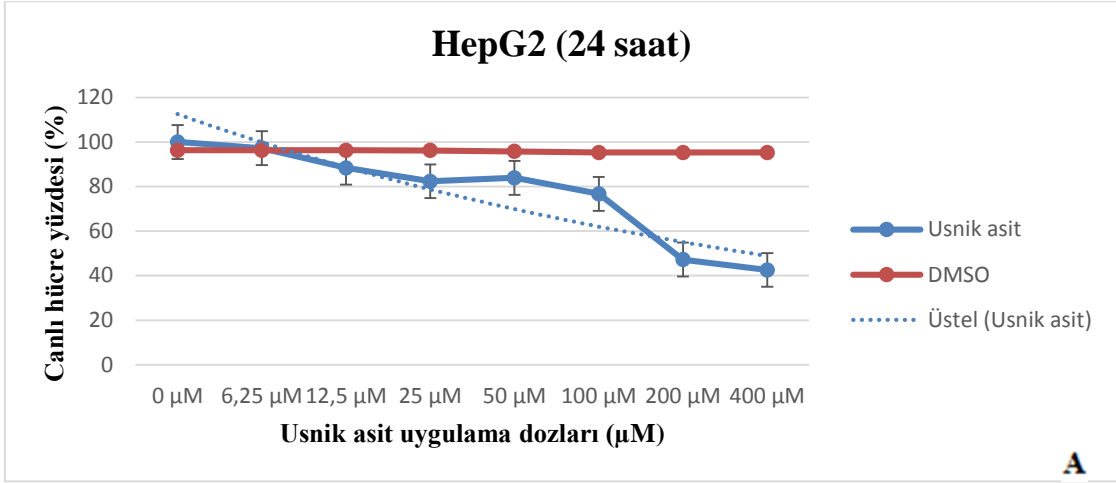
Şekil 5.16. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş CaCo2 hücreleri



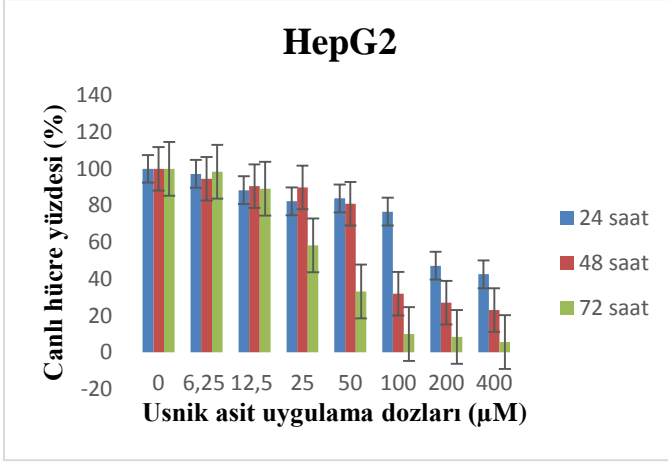
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	92.3	87.8	78.8
12,5 µM	87.2	61.4	37.3
25 µM	72.2	38.9	18.3
50 µM	67.2	23.2	8.8
100 µM	51.3	20.3	7.1
200 µM	44.9	17.0	5.5
400 µM	34.1	15.1	5.0

Şekil 5.17. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş CaCo2 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi

Şekil 5.16 ve Şekil 5.17’de görüldüğü gibi ticari usnik asit’in 48 saat 25 µM uygulaması CaCo2 canlı hücre sayısını %61.1 oranında azaltmıştır. 72 saat 12.5 µM konsantrasyonda ticari usnik asit uygulamasında (%37) ise 48 saat 25 µM uygulaması (%39) ile benzer oranda canlı hücre sayısında azalma meydana gelmiştir.



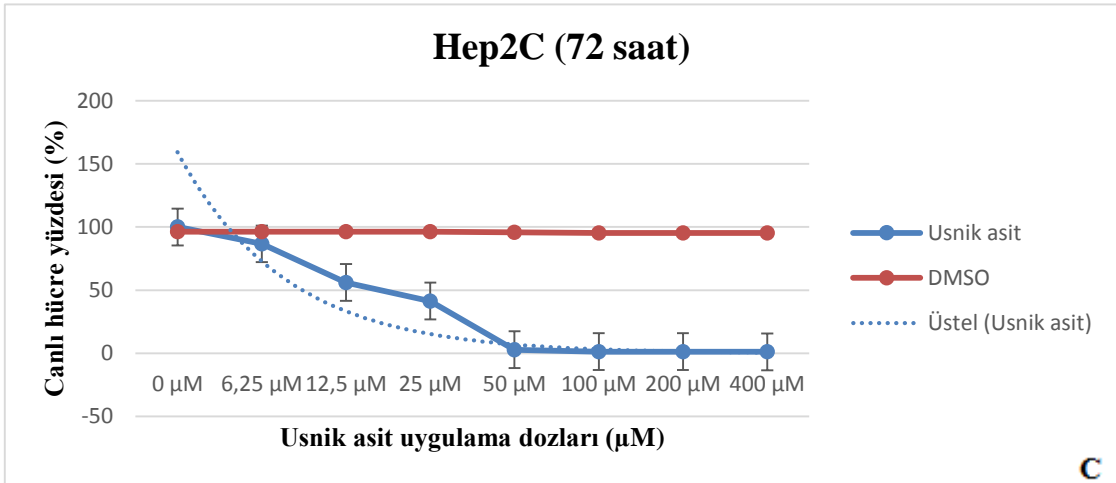
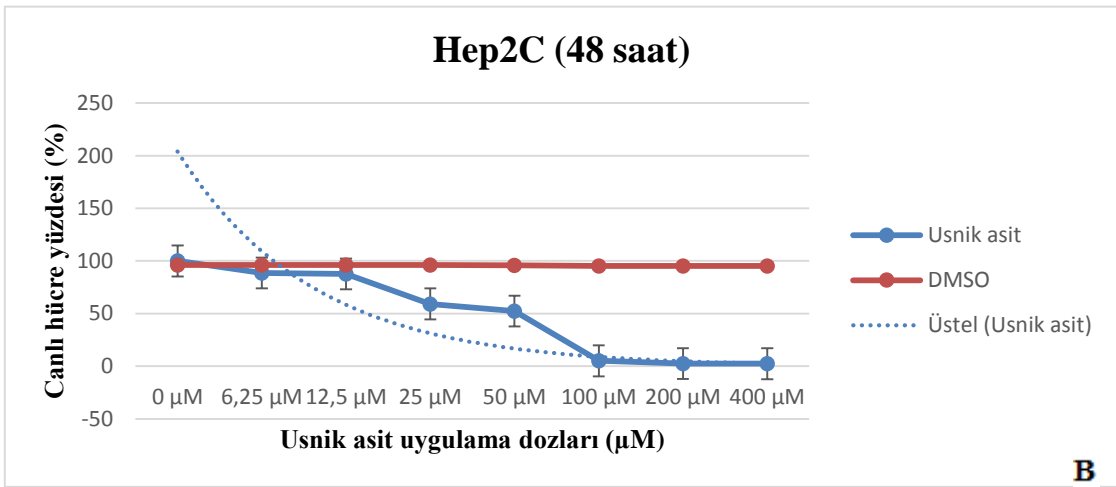
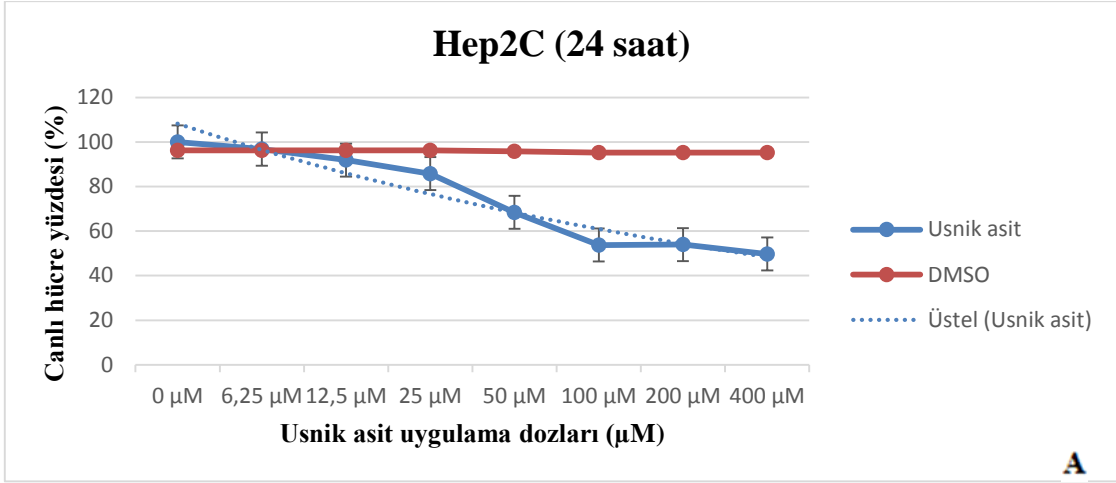
Şekil 5.18. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş HepG2 hücreleri



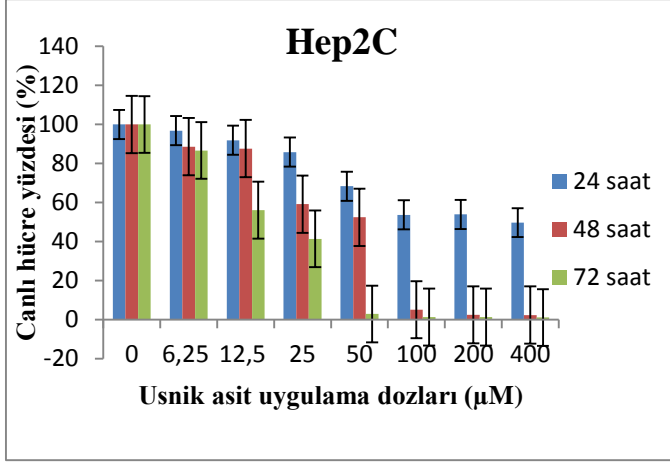
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	97.2	94.5	98.5
12,5 µM	88.4	90.6	89.2
25 µM	82.4	89.9	58.4
50 µM	83.9	81.0	33.3
100 µM	76.7	32.0	10.0
200 µM	47.2	27.0	8.4
400 µM	42.6	23.1	5.6

Şekil 5.19. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş HepG2 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi

Şekil 5.18 ve Şekil 5.19’de görüldüğü gibi ticari usnik asit’in 72 saat 25 µM ve daha yüksek konsantrasyonlarında (50-100-200 ve 400 µM) uygulanması HepG2 hücre hattı üzerine hücre canlılığını en etkili şekilde azaltmıştır.



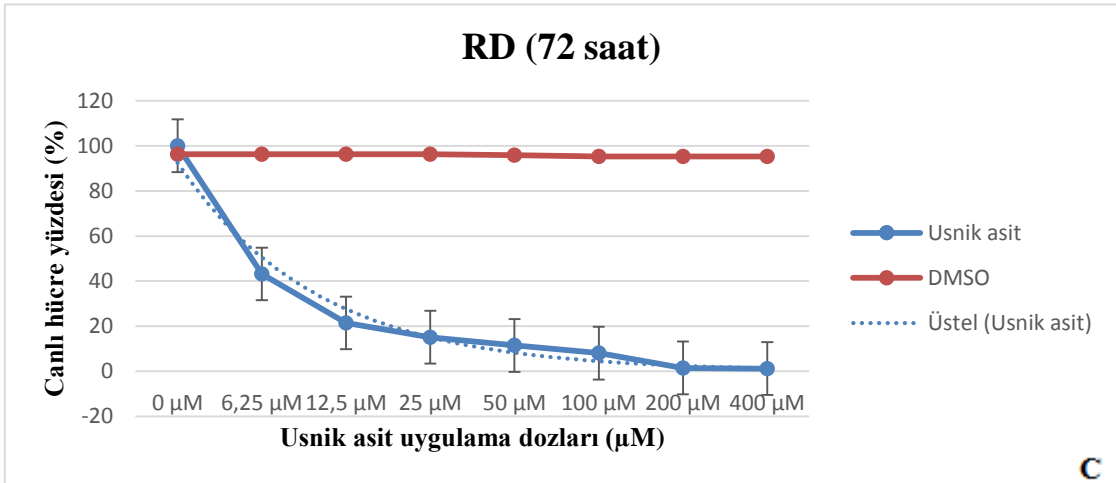
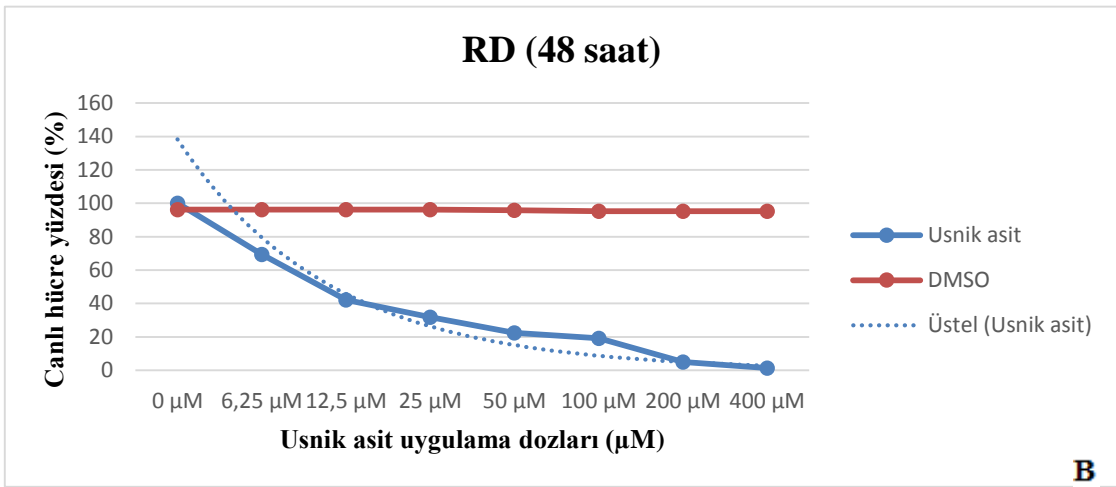
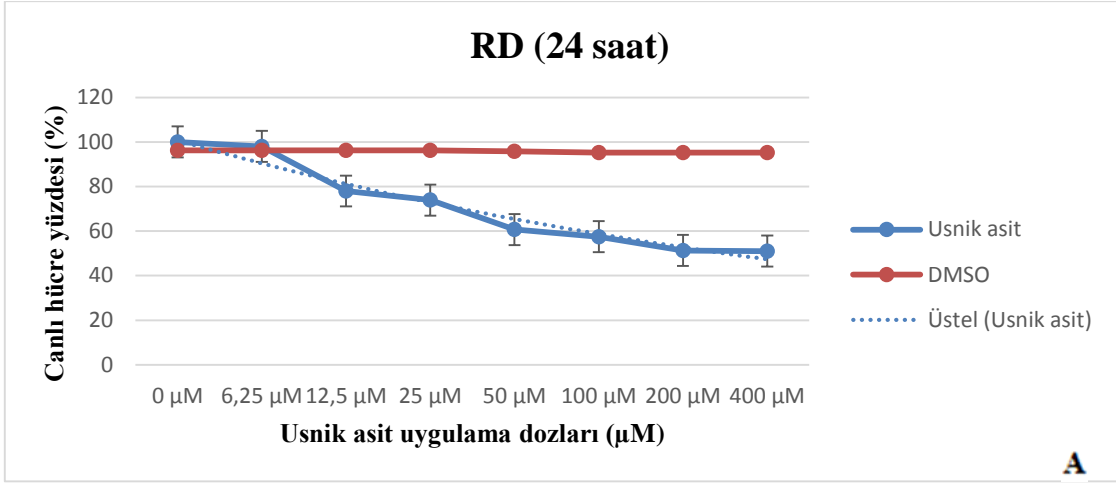
Şekil 5.20. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş Hep2C hücreleri



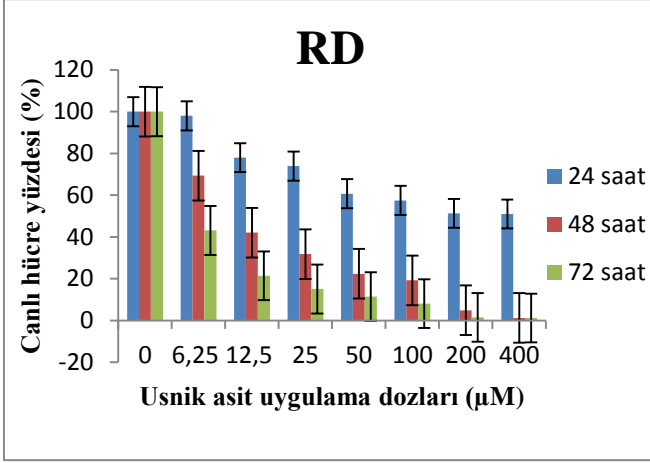
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	96.8	88.6	86.6
12,5 µM	91.9	87.6	56.1
25 µM	85.8	59.2	41.4
50 µM	68.4	52.5	2.9
100 µM	53.7	5.1	1.4
200 µM	53.9	2.5	1.4
400 µM	49.7	2.4	1.2

Şekil 5.21. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş Hep2C hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi

Şekil 5.20 ve Şekil 5.21’de görüldüğü gibi ticari usnik asit’in 48 saat 25 µM uygulaması Hep2C canlı hücre yüzdesini yaklaşık olarak %40 indirerek hücre canlılığını yüksek oranda azaltmıştır. Özellikle 24 saat ve 48 saat UA uygulaması sonucundaki hücre canlılığını azaltıcı etkisine baktığımız zaman UA sekonder metaboliti için 48 saat en etkin bekleme süresi olarak görülmektedir.



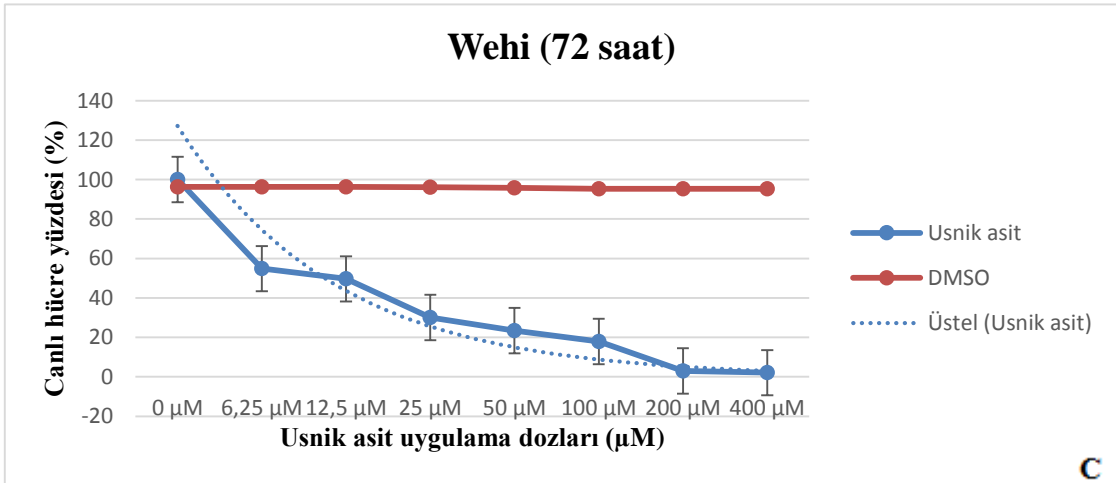
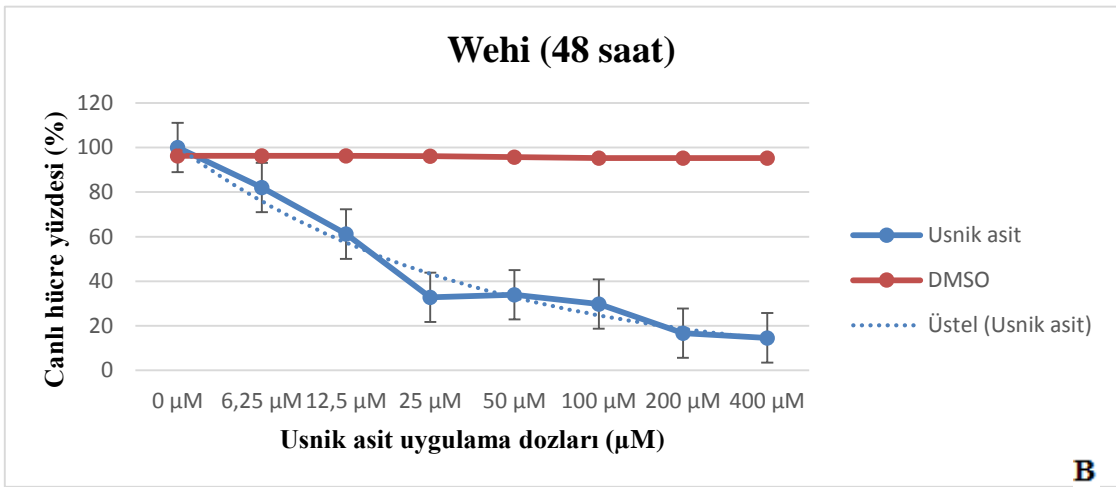
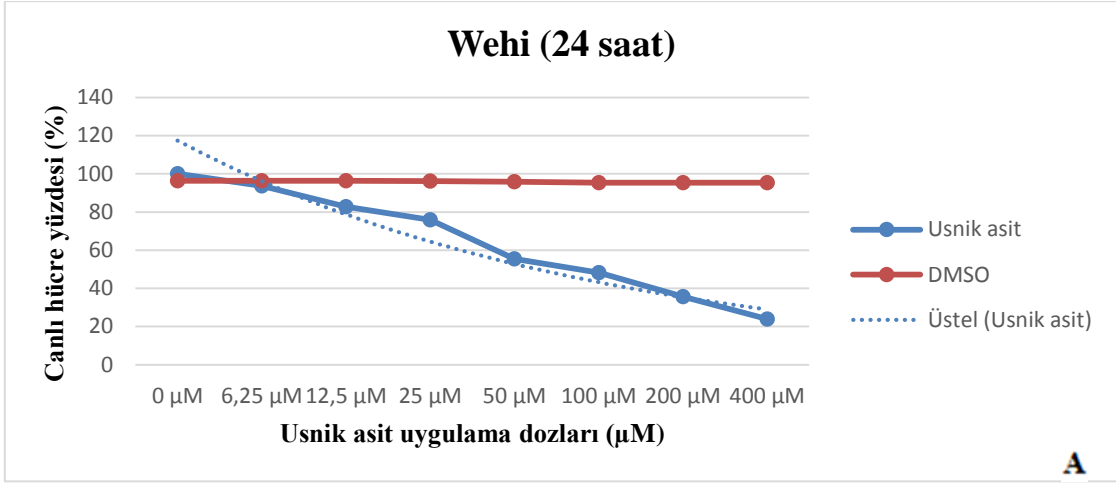
Şekil 5.22. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş RD hücreleri



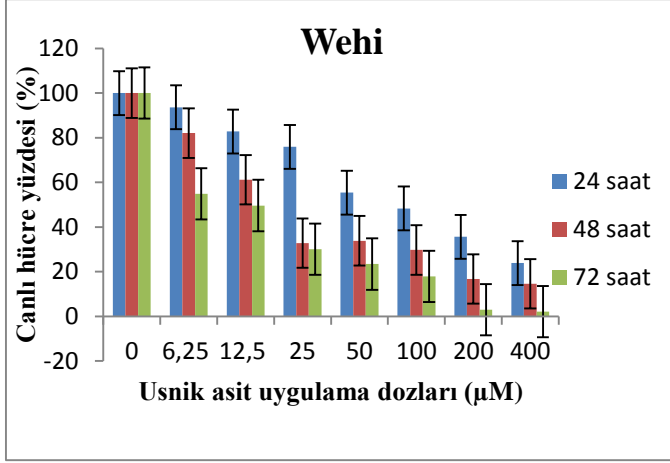
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	98.0	69.4	43.2
12,5 µM	78.0	42.1	21.5
25 µM	73.9	31.8	15.1
50 µM	60.7	22.4	11.5
100 µM	57.5	19.3	8.1
200 µM	51.3	4.9	1.5
400 µM	51.0	1.3	1.2

Şekil 5.23. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş RD hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi

Şekil 5.22 ve Şekil 5.23’de görüldüğü gibi zamana bağlı olarak ticari usnik asit’in 12.5 µM konsantrasyonda 48 saat uygulanması sonucunda yaklaşık %60 oranında canlılığı azaltıcı etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Yine UA’in 12.5 µM konsantrasyonunda 72 saat uygulaması sonucunda % 80 oranında hücre canlılığını azaltmıştır. 48 ve 72 saatin tersine 24 saatte 6.25 µM ile 400 µM UA konsantrasyonu uygulaması sonucunda ancak en fazla %50 oranında hücre canlılığını azaltmıştır.



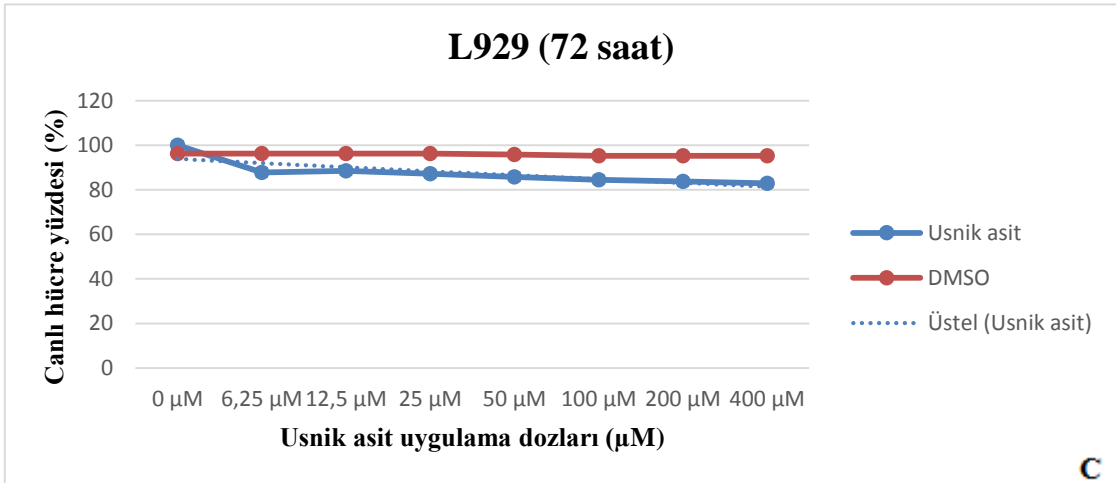
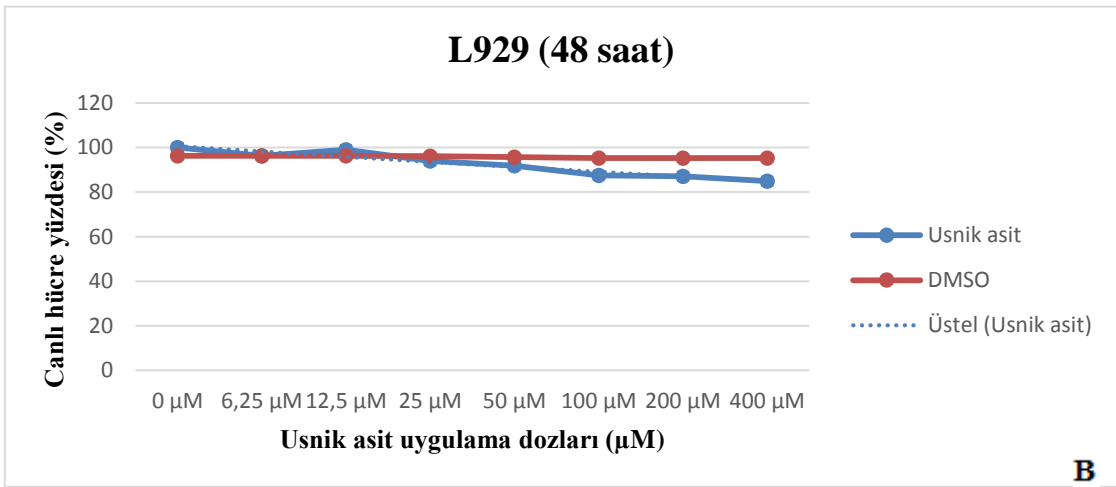
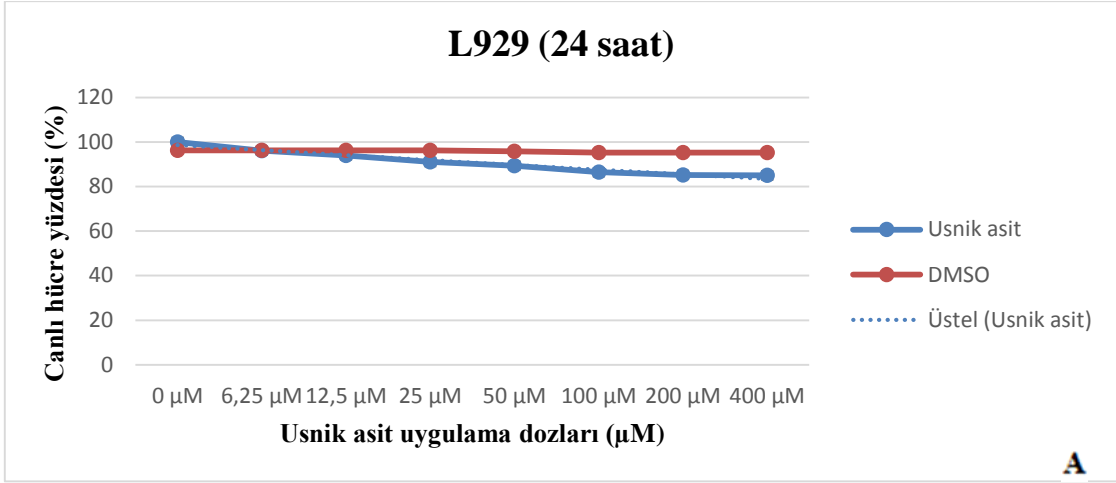
Şekil 5.24. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş Wehi hücreleri



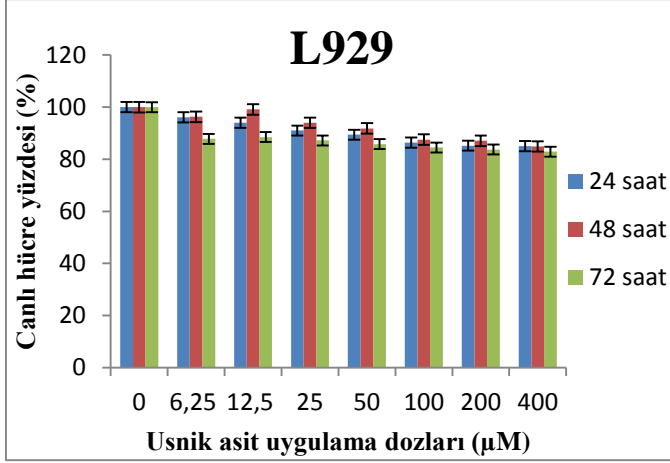
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	93.7	82.1	54.9
12,5 µM	82.8	61.2	49.6
25 µM	75.9	32.8	30.1
50 µM	55.4	33.9	23.4
100 µM	48.3	29.7	17.9
200 µM	35.6	16.7	3.0
400 µM	23.9	14.6	2.1

Şekil 5.25. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş Wehi hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi

Şekil 5.24 ve Şekil 5.25’de görüldüğü gibi 50 µM ticari usnik 24 saat boyunca uygulanınca yaklaşık %50 oranında hücre canlılığını azaltırken yine aynı konsantrasyonda 50 µM UA’in 48 ve 72 saat uygulaması sonucunda yaklaşık %70 ile %80 aralığında hücre canlılığını azaltmıştır.



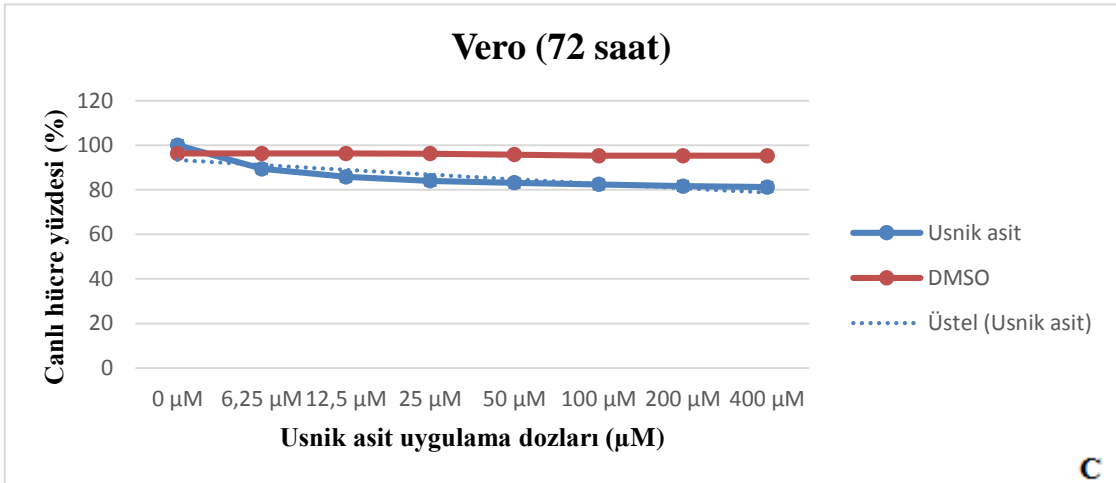
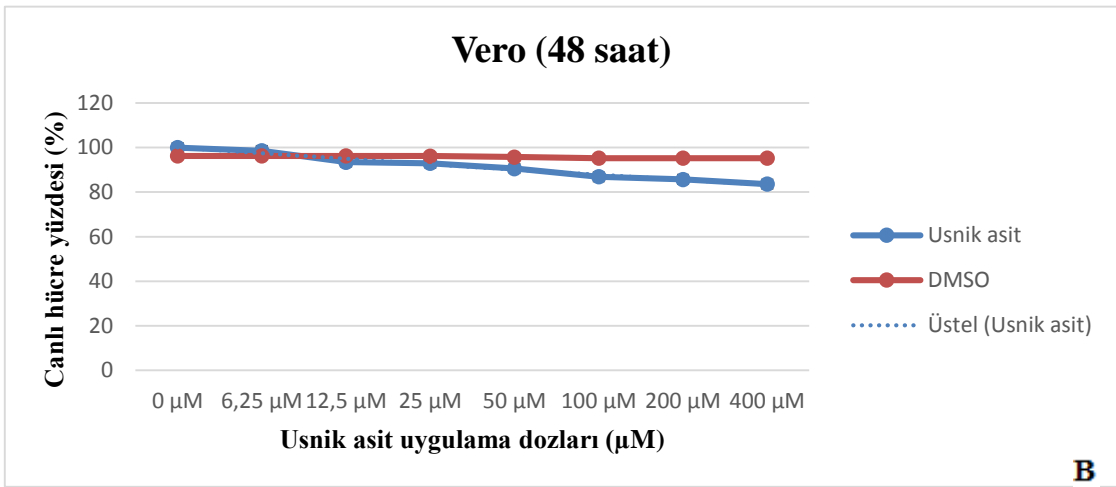
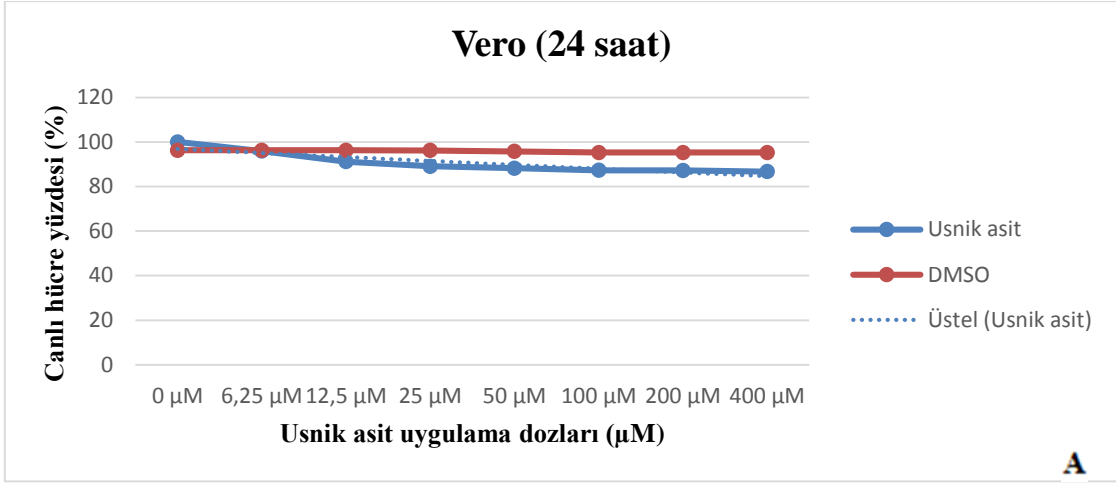
Şekil 5.26. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş L929 hücreleri



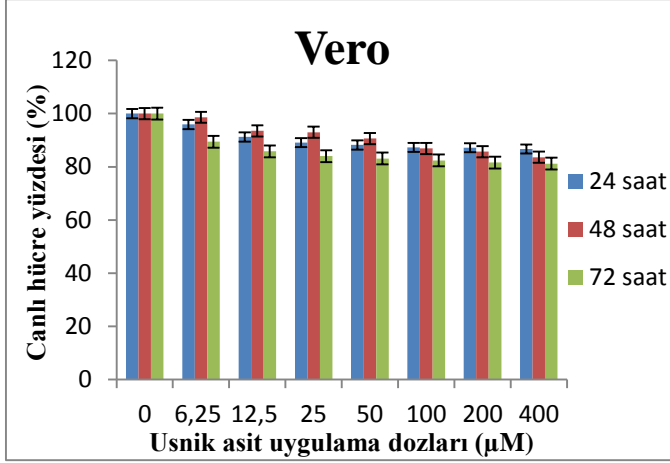
Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	96.1	96.3	87.8
12,5 µM	94.0	99.1	88.5
25 µM	91.0	94.0	87.2
50 µM	89.4	91.8	85.8
100 µM	86.4	87.5	84.5
200 µM	85.2	87.1	83.7
400 µM	85.0	84.9	82.9

Şekil 5.27. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş L929 hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi

Şekil 5.26 ve Şekil 5.27’de görüldüğü gibi L929 normal hücre hattı üzerine ticari usnik asit uygulaması canlı hücre yüzdesinde zamana (24-48-72 saat) ve konsantrasyona (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 µM) bağlı olarak yaklaşık %15 oranında bir azalma meydana getirmiştir.



Şekil 5.28. 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) ticari usnik asit ile muamele edilmiş Vero hücreleri



Usnik asit uygulama dozları	24 saat	48 saat	72 saat
0 µM	100.0	100.0	100.0
6,25 µM	95.9	98.6	89.4
12,5 µM	91.2	93.5	85.8
25 µM	89.1	93.0	84.0
50 µM	88.2	90.6	83.1
100 µM	87.3	86.9	82.4
200 µM	87.2	85.7	81.6
400 µM	86.7	83.6	81.2

Şekil 5.29. 24 saat, 48 saat ve 72 saat ticari usnik asit ile muamele edilmiş Vero hücre grafiği ve canlı hücre yüzdesi

Şekil 5.28 ve Şekil 5.29'de görüldüğü gibi Vero normal hücre hattı üzerine ticari usnik asit'in artan konsantrasyonlarında ve zamanda uygulanması yaklaşık %18'lik hücre canlılığında azalma meydana getirmiştir. Ticari UA'in diğer normal hücrelere olan L929'da gözlemlenen etkisi benzer şekilde Vero hücrelerinde gözlemlenmiştir.

Doğal usnik asit izolasyonunu *Usnea diffracta* liken türünden yapılmış olup ticari usnik asit'de firmadan temin edilmiştir. Elde edilen MTT deneyi sonuçlarına göre; doğal olarak *Usnea diffracta* türünden izole edilen usnik asit ticari usnik asit ile benzer zaman aralığında (48 saat) yakın hücre canlılığında azalma meydana getirmiştir. Dolayısıyla Türkiye'nin Trabzon Uzungöl Soğanlı (37°61'E, 44°84'N, 1799 m) bölgesinden toplanan liken örneklerinden izole edilen usnik asit'de sağlık biyoteknoloji alanında ticarileştirilip ilgili kullanıcıların hizmetine sunulması kanaatimizce uygundur. Ancak bu amaçlı kullanım için yeterli usnik asit üretebilme yetisine ve altyapısına sahip laboratuvar imkanlarının sağlanmasında kaçınılmaz bir gerçektir. Ticari ve doğal usnik asit MTT uygulaması sonucu verilerin benzer çıkması nedeniyle tezin burdan sonraki kısmı olan EC50 değeri belirleme, belirlenen EC50 değerinin hücrelere uygulanması, RNA izolasyonu ve qRT-PCR analizi ticari usnik asit üzerinden devam ettirilmiştir.

5.5. MTT TESTİ SONUCUNDA UYGUN USNİK ASİT (EC50) DEĞERİNİ BELİRLEME

Tez kapsamında doğal liken türünden izole edilmiş usnik asit veya ticari usnik asit'in MTT testi uygulaması sonucunda zamana bağlı en etkili hücre canlılığında azalmaya neden olan

etkinin tüm hücreler için 48. saatte gözlemlenmiştir. Bu nedenle tüm hücreler için 48. saatte belirlenen EC50 değeri ile tez çalışmasına devam ettirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen absorbans değerlerine ait veriler ile EC50 değeri ve canlılık oranları hesaplanmıştır. EC50 değerinin hesaplanması için absorbans değerleri (OD değerleri) logaritma tabanına çevrilmiş, daha sonra Graphpad Prism 6 programı kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 5.2. EC50 değerleri (*Normal hücre hatları için uygulama dozları)

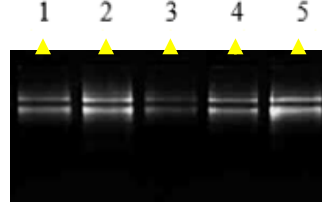
Kanser Hücre Hattı	EC50
CaCo2	14.1 μ M
HepG2	65.7 μ M
Hep2C	43.6 μ M
RD	45.8 μ M
Wehi	31.7 μ M
Normal Hücre Hattı	*EC50
L929	30.2 μ M
Vero	23.5 μ M

Normal hücreler (L929 ve Vero) üzerine usnik asit’in hücre canlılığını öldürücü etkisinin oldukça az olduğu tespit edilmiş olup Graphpad Prism 6 programı ile EC50 değerleri hesaplanamamıştır. Çalışmamızda normal hücrelere de usnik asit uygulayıp mRNA boyutunda doğrulama yapabilmek amacıyla kanserli hücrelere uygulanan EC50 değerlerine yakın değerlerde usnik asit uygulaması yapılmıştır.

5.6. qRT-PCR VE TOTAL RNA İZOLASYONU

CaCo2, HepG2, Hep2C, RD, Wehi, L929 ve Vero hücrelerine EC50 değerine denk gelen dozda usnik asit uygulandıktan sonra Trizol yöntemine göre RNA izole edilmiştir ve RNA miktarı spektrofotometrik ölçümlerle (Nanodrop 1000) belirlenmiştir (Çizelge 5.3). HepG2 ve CaCo2 hücresinden RNA izolasyonunda başarı sağlanamamıştır. Bu nedenle tez çalışmasında CaCo2 ve HepG2 hücrelerine ait qRT-PCR sonuçları yer almamaktadır. Tüm

hücre hatlarına ait EC50 değerlerine denk gelen UA konsantrasyonu iki tekrarlı olarak ayrıca DMSO ve MEM’de kontrol olarak iki tekrarlı olacak şekilde 6’lık well plate’de uygulanmıştır. İzole edilen RNA’lar %2’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol grubu edilmiştir (Şekil 5.30).



Şekil 5.30. Usnik asit uygulaması sonrasında izole edilen RNA örneklerinin %2’lik agaroz jel görüntüsü (1: Hep2C, 2: RD, 3: Wehi, 4: L929, 5: Vero)

5.6.1. TOTAL RNA İZOLASYON SONUÇLARI

Çizelge 5.3. Total RNA izolasyonu sonucu miktar ve saflık oranları m

Örnek Adı	ng/µl	260/280	260/230
HEP 2C UA (1.Tekrar)	22.92	1.58	0.6
HEP 2C UA (2.Tekrar)	30.75	1.64	0.33
HEP 2C DMSO (1.Tekrar)	139.91	1.81	1.02
HEP 2C DMSO (2.Tekrar)	72.38	1.8	1.31
HEP 2C MEM (1.Tekrar)	141.0	1.89	1.69
HEP 2C MEM (2.Tekrar)	110.0	1.83	1.79
RD UA (1.Tekrar)	90.16	1.85	1.07
RD UA (2.Tekrar)	95.1	1.84	1.1
RD DMSO (1.Tekrar)	107.04	1.82	1.126
RD DMSO (2.Tekrar)	166.235	1.825	1.385
RD MEM (1.Tekrar)	60.22	1.67	0.803
RD MEM (2.Tekrar)	135.46	1.85	1.37
WEHİ UA (1.Tekrar)	12.15	1.86	0.91
WEHİ UA (2.Tekrar)	18.18	1.82	0.84
WEHİ DMSO (1.Tekrar)	189.87	1.86	2.07
WEHİ DMSO (2.Tekrar)	186.49	1.87	1.92
WEHİ MEM (1.Tekrar)	151.38	1.88	1.81
WEHİ MEM (2.Tekrar)	168.04	1.93	0.94
L929 UA (1.Tekrar)	57.04	1.79	1.09
L929 UA (2.Tekrar)	59.67	1.82	1.02
L929 DMSO (1.Tekrar)	285.26	1.9	1.72
L929 DMSO (2.Tekrar)	264.72	1.91	1.95
L929 MEM (1.Tekrar)	327.33	1.91	1.84
L929 MEM (2.Tekrar)	258.47	1.89	2.03
VERO UA (1.Tekrar)	87.79	1.82	1.62
VERO UA (2.Tekrar)	63.09	1.78	1.19
VERO MEM (1.Tekrar)	144.97	1.85	1.88
VERO MEM (2.Tekrar)	5.485	1.425	0.365
VERO DMSO (1.Tekrar)	140.47	1.85	1.7
VERO DMSO (2.Tekrar)	98.22	1.75	1.05

5.6.2. cDNA SENTEZİ SONUÇLARI

RNA örneklerinden cDNA sentezi, Roche cDNA Synthesis Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.4’de RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA’ların saflık ve miktar ölçümleri yer almaktadır.

Çizelge 5.4. Usnik asit uygulanmış farklı hücre hatlarından elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA’ların miktar ve saflık tayinleri

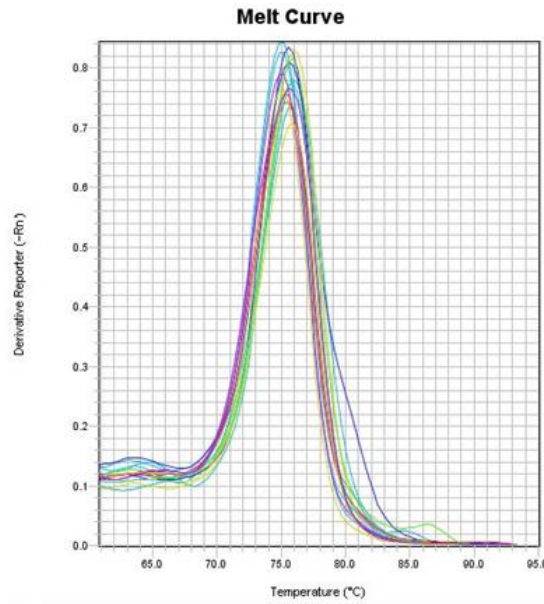
Örnek Adı	ng/µl	260/280	260/230
HEP 2C UA (1.Tekrar)	1734.61	1.8	2.24
HEP 2C UA (2.Tekrar)	1633.33	1.79	2.11
HEP 2C DMSO (1.Tekrar)	1487.21	1.82	2.24
HEP 2C DMSO (2.Tekrar)	1796.64	1.8	2.22
HEP 2C MEM (1.Tekrar)	1689.32	1.82	2.23
HEP 2C MEM (2.Tekrar)	2160.38	1.79	2.23
RD UA (1.Tekrar)	1167.47	1.81	2.24
RD UA (2.Tekrar)	1450.38	1.81	2.22
RD DMSO (1.Tekrar)	1100.92	1.81	2.26
RD DMSO (2.Tekrar)	1582.43	1.8	2.22
RD MEM (1.Tekrar)	1006.41	1.81	2.28
RD MEM (2.Tekrar)	1399.41	1.82	2.25
WEHİ UA (1.Tekrar)	1949.36	1.81	2.22
WEHİ UA (2.Tekrar)	1553.01	1.79	2.16
WEHİ DMSO (1.Tekrar)	1393.79	1.81	2.24
WEHİ DMSO (2.Tekrar)	1646.68	1.81	2.26
WEHİ MEM (1.Tekrar)	1854.64	1.81	2.26
WEHİ MEM (2.Tekrar)	1439.75	1.81	2.22
L929 UA (1.Tekrar)	1599.65	1.82	2.24
L929 UA (2.Tekrar)	1373.05	1.81	2.27
L929 DMSO (1.Tekrar)	1400.31	1.82	2.25
L929 DMSO (2.Tekrar)	1215.88	1.82	2.27
L929 MEM (1.Tekrar)	1170.22	1.8	2.25
L929 MEM (2.Tekrar)	1576.86	1.81	2.23
VERO UA (1.Tekrar)	1271.37	1.8	2.2
VERO UA (2.Tekrar)	1932.36	1.82	2.24
VERO MEM (1.Tekrar)	1261.22	1.81	2.25
VERO MEM (2.Tekrar)	1326.21	1.91	2.00
VERO DMSO (1.Tekrar)	1409.68	1.77	2.18
VERO DMSO (2.Tekrar)	1830.53	1.79	2.19

5.6.3. qRT-PCR SONUÇLARI

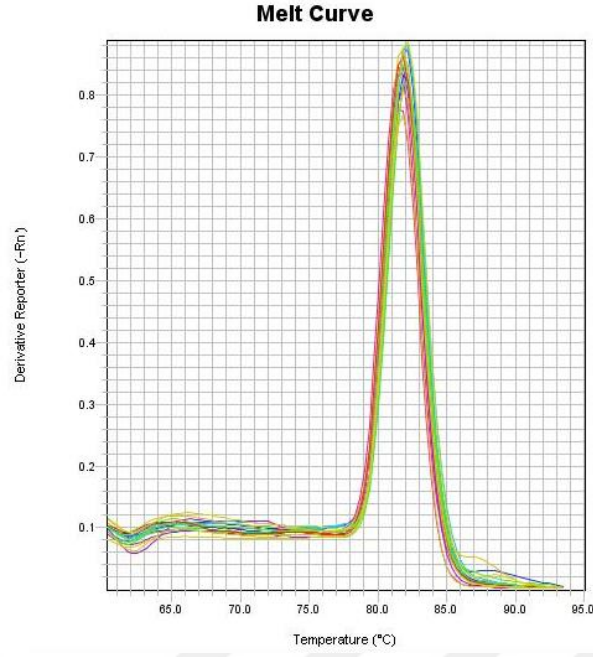
Real Time PCR reaksiyonları Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvar'ında üç tekrarlı olarak Roche Real Time PCR System Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir.

Apoptoz yolağında işlevi olan TP53, Bcl-2, BAX ve GAPDH genleri hücre içerisinde birçok görevde yer almaktadır. Memeli hücrelerinde oluşan DNA hasarına p53 tümör supressor (TP53) tarafından uygun cevap verilir (120). p53 sekans spesifik transkripsiyon faktörüdür ve DNA hasarı olan hücre çekirdeğinde aktif hale geçer. Buna karşılık proliferasyonun kontrolünde ya da apoptozisde rol oynayan çeşitli genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde de görev alır (121). BAX gen ürünleri Bcl-2'nin intraselüler partneridir. Bax ekspresyonu apoptozu durdurmaz onun yerine Bcl-2'nin inhibisyonunu inhibe eder (122). Apoptoz inhibisyonu Bcl-2 ve BAX gen ekspresyonu arasındaki dengeye bağlıdır (123). Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) housekeeping gen olarak kontrol amaçlı kullanılmıştır (124).

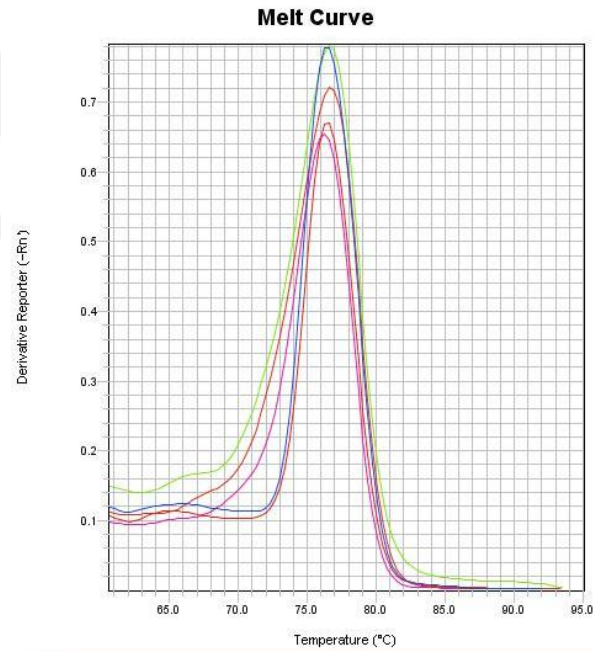
TP53, Bcl-2, Bax ve GAPDH primerlerinin güvenilirliğini test etmek için erime eğrisi (Melting curve) analizi yapılmış ve primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin önüne geçilmeye çalışılmıştır. Çalışılan tüm genler için örneklere ait erime eğrisi analiz sonuçları Şekil 5.31-Şekil 5.34 arasında yer almaktadır.



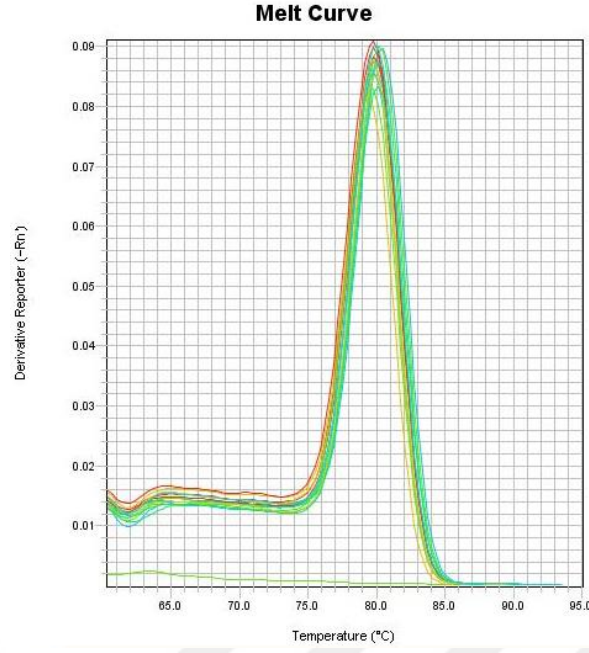
Şekil 5.31. Çalışılan örneklerde TP53 geninin erime eğrisi analizi



Şekil 5.32. Çalışılan örneklerde Bcl-2 geninin erime eğrisi analizi

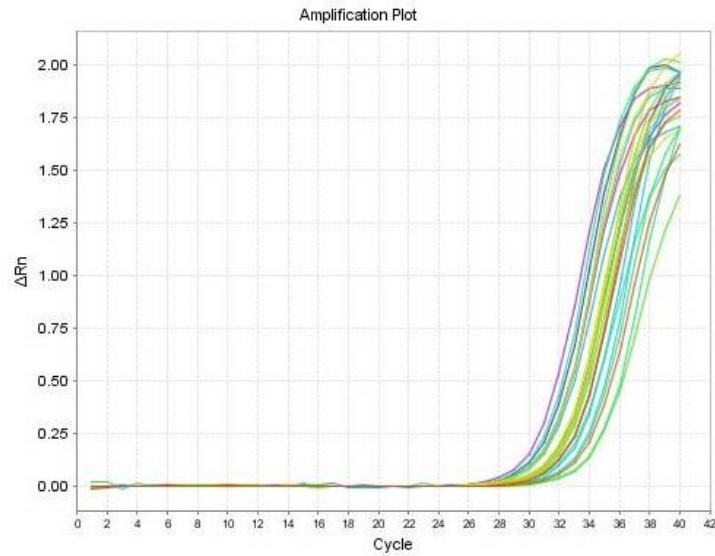


Şekil 5.33. Çalışılan örneklerde Bax geninin erime eğrisi analizi

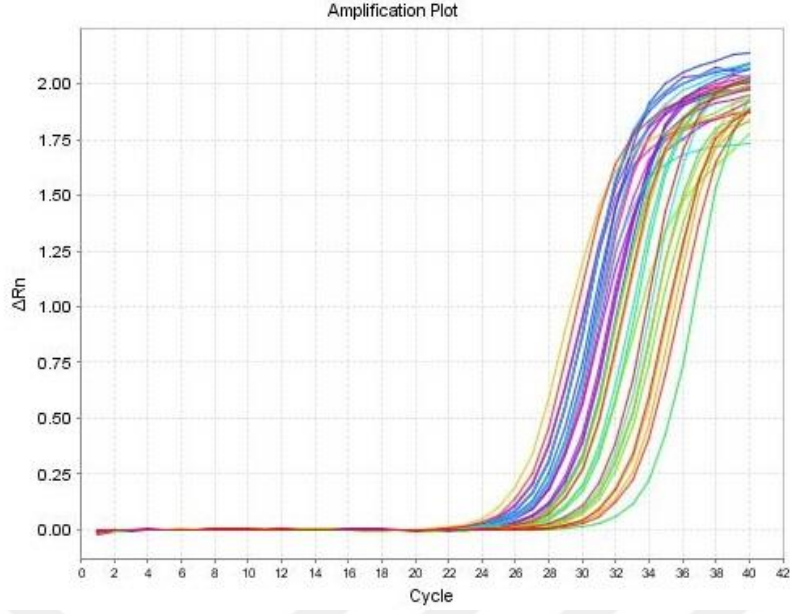


Şekil 5.34. Çalışılan örneklerde GAPDH geninin erime eğrisi analizi

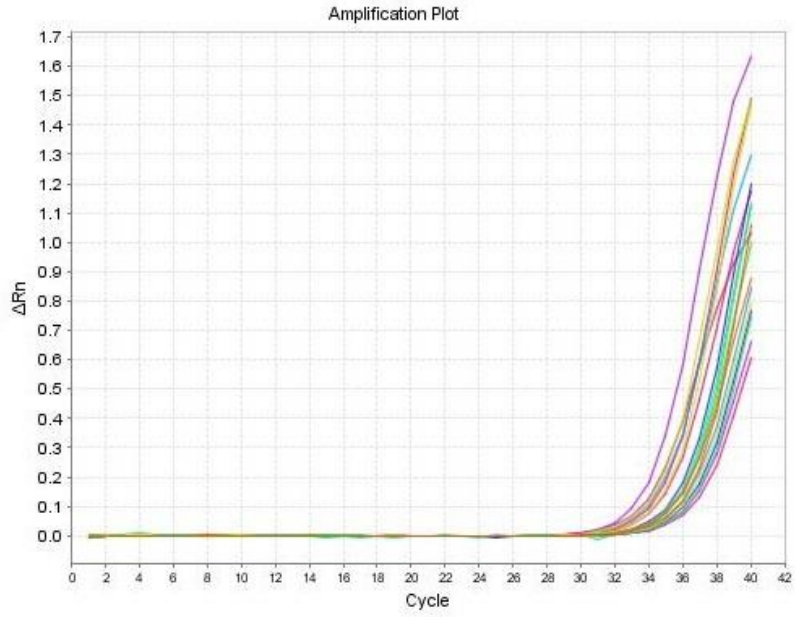
Optimal konsantrasyonu belirlenmiş usnik asit sekonder metaboliti uygulanmış hücreler Trizol ile kazınarak hemen -80 °C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır. Daha sonra bu örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real time PCR reaksiyonu yapılmıştır. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans ışığın şiddetine göre örneklerin Ct (Cycle threshold-PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış olan değer) değerleri belirlenmiştir. Çalışılan tüm genler için örneklere ait Real time PCR pik profilleri Şekil 5.35-Şekil 5.38 arasında yer almaktadır.



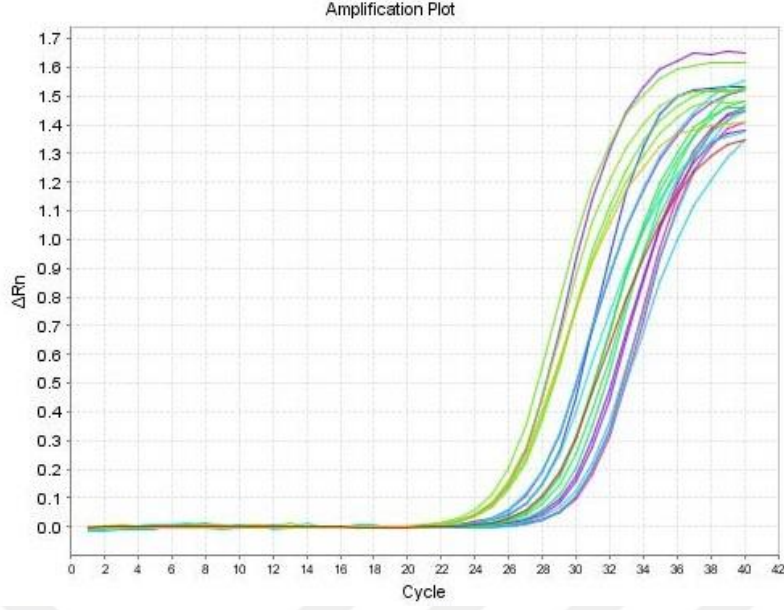
Şekil 5.35. Çalışılan örneklerde TP53 geninin Real Time PCR pik profilleri



Şekil 5.36. Çalışılan örneklerde Bcl-2 geninin Real Time PCR pik profilleri

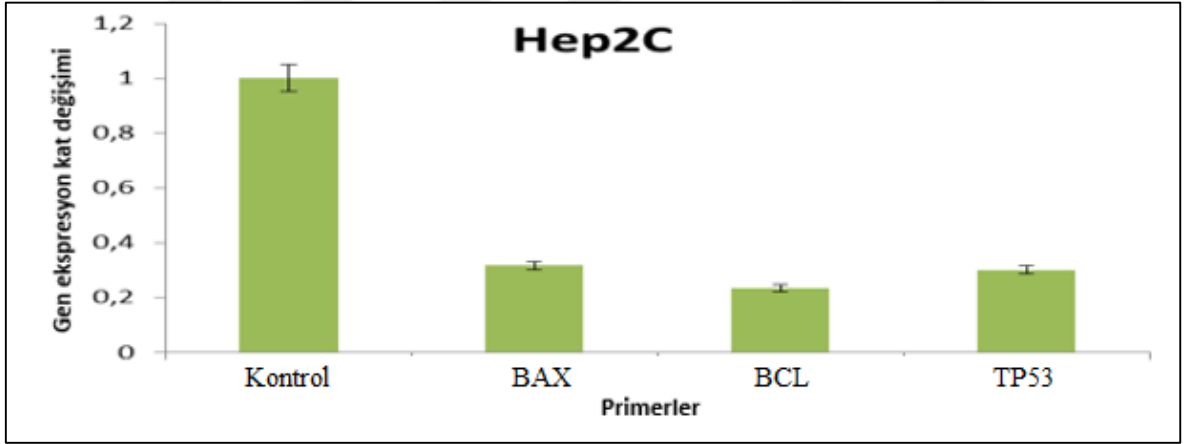


Şekil 5.37. Çalışılan örneklerde Bax geninin Real Time PCR pik profilleri



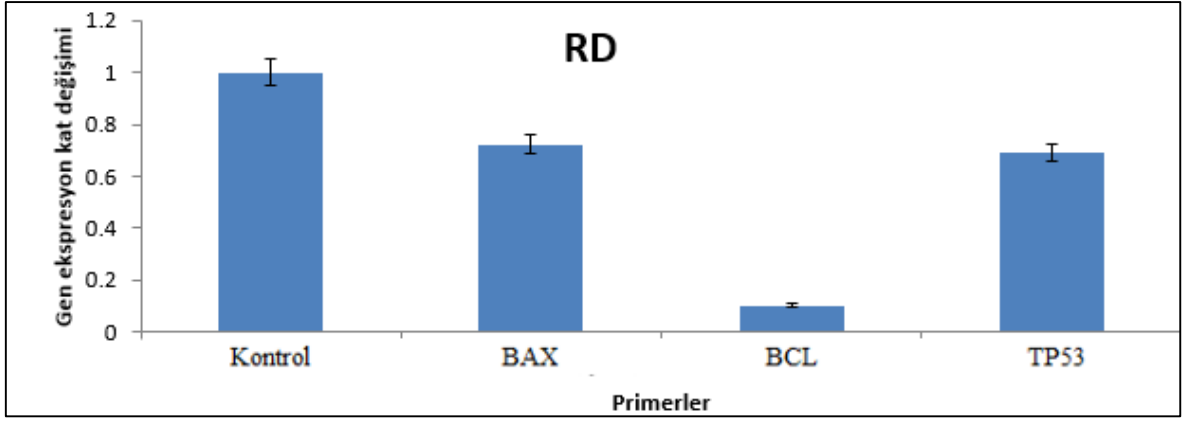
Şekil 5.38. Çalışılan örneklerde GAPDH geninin Real Time PCR pik profilleri

Usnik asit'in Hep2C, RD, Wehi, L929 ve Vero hücre hatları üzerindeki BAX, BCL ve TP53 genlerine ait mRNA ekspresyon seviyeleri qT-PCR ile belirlendi (Şekil 5.39-Şekil 5.43).



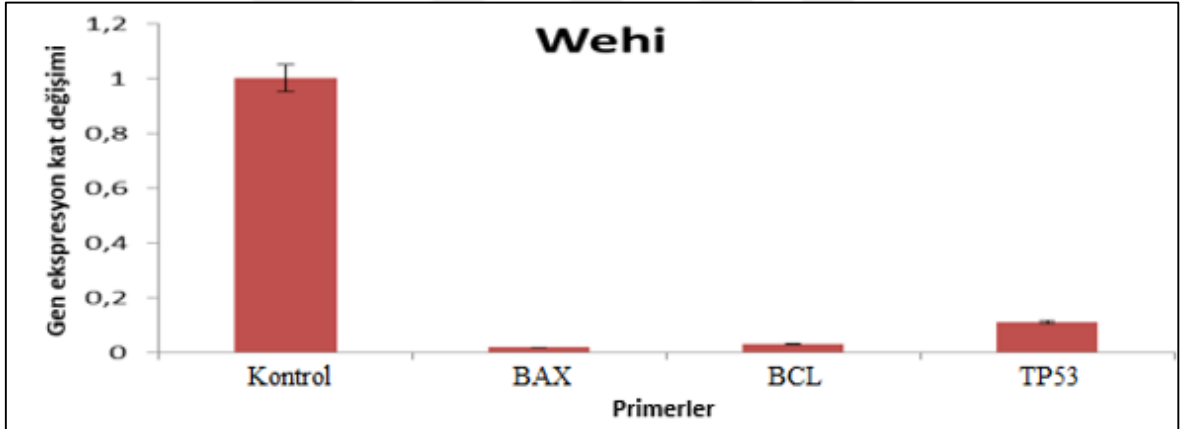
Şekil 5.39. Hep2C hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri

Şekil 5.39'de görüldüğü gibi Hep2C hücre hattına usnik asit uygulamasından sonra BAX, BCL ve TP53 tümör supressor genlerinin ekspresyonunda kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda yaklaşık olarak 5 kat azalma meydana gelmiştir ($p < 0.05$). BCL antiapoptotik gen ekspresyonundaki azalma BAX ve TP53 genlerine oranla daha az olmuştur ($p < 0.05$).



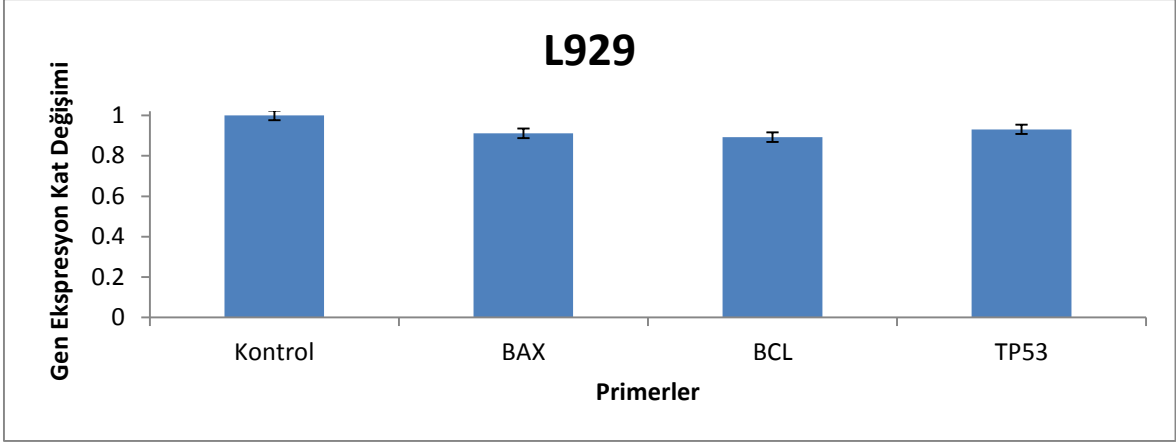
şekil 5.40. RD hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri

şekil 5.40’da görüldüğü gibi RD hücre hattına usnik asit uygulaması incelenen genlerin hepsinde kontrol grubuna kıyasla bir azalma meydana getirmiştir. En fazla gen ifadesinde azalma kontrol grubuna kıyasla 8 kat azalma ile BCL geni ekspresyonunda olmuştur ($p < 0.05$). BAX ve TP53 genleri ise kontrol ile karşılaştırıldığında yaklaşık 3 kat azalma göstermiştir ($p < 0.05$).



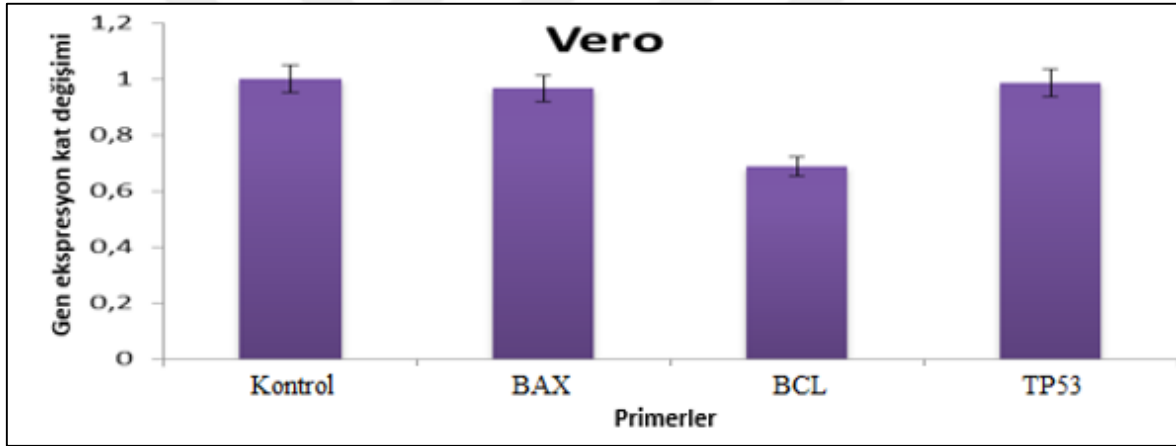
şekil 5.41. Wehi hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri

şekil 5.41’da görüldüğü gibi Wehi hücre hattına usnik asit uygulaması sonrası incelenen tüm tumor supressor genlerinde önemli ölçüde azalma meydana gelmiştir. Kontrol grubuna göre BAX ve BCL gen ifadesinde yaklaşık 9.5 kat azalma meydana gelirken TP53 gen ifadesinde 8.8 kat azalma meydana gelmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 5.42. L929 hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri

Şekil 5.42’de görüldüğü gibi L929 normal hücre hattına usnik asit uygulamasından sonra BAX, BCL ve TP53 gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre azalma 1 kattan az olmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 5.43. Vero hattında apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri

Şekil 5.43’de görüldüğü gibi Vero normal hücre hattına usnik asit uygulamasından sonra BAX ve TP53 gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre azalma 1 kat iken BCL gen ekspresyonunda bu azalma yaklaşık olarak 3 kat olmuştur ($p < 0.05$).

BAX, BCL ve TP53 tümör supressor genlerinin mRNA seviyesindeki ifade analizinin qRT-PCR ile belirlenmesi sonucunda apoptozla ilişkili genlerin ifadelerinde en fazla azalma Wehi kanser hücre hattında meydana gelmiş olup moleküler boyutta apoptoza gidiş bu hücre hattında en fazla tespit edilmiştir.

Usnik asit MTT analizi sonucunda en etkili hücre canlılığında azalma Wehi kanser hücre hattı üzerinde zamana ve konsantrasyonlara bağlı olarak göstermiştir. MTT analizi sonuçları ile qRT-PCR analizi sonuçları beraber değerlendirildiğinde; UA uygulaması sonucu Wehi hücresinde görülen yüksek hücre canlılığını azaltıcı etki mRNA boyutunda yapılan gen ifadesi analizi sonuçları ile de doğrulanmıştır. L929 ve Vero normal hücre hatlarında kanserli hücre hatlarına (Hep2C, RD, Wehi) kıyasla BAX, BCL ve TP53 tumor supressor genlerinin ifadesinde azalma gözlenmemiştir ve usnik asitin hücre canlılığını azaltıcı etkisi normal hücre hatları üzerine özellikle de L929 hücre hattına en az olduğu belirlenmiştir.



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Bu çalışmada ticari olarak satın alınmış usnik asit ile tarafımızca doğadan toplanmış *Usnea diffracta* liken türünden izole edilmiş usnik asit'in daha önce hiç denenmemiş farklı tipte kanser hücre hatları üzerine hücre canlılığını azaltıcı etkisi karşılaştırılmıştır. Doğal ve ticari usnik asit karşılaştırıldığında kullanılan hücre hatları üzerinde benzer hücre canlılığını azaltıcı etki gözlenmiştir. Ayrıca usnik asit'in hücre canlılığını azaltıcı etkisinin daha önceki çalışmalarda apoptotik yolak ile ilişkili olmasının gösterilmesinden dolayı bu tez kapsamında mRNA boyutunda apoptozla ilgili genlerin ifade profilleri araştırılmıştır. Usnik asit'in apoptozla ilişkili gen ifade profilleri üzerine etkisi TP53, Bcl ve BAX tümör supressor genlerinde qRT-PCR analiziyle incelenmiştir.

6.1.1. USNİK ASİT'İN FARKLI HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Usnik asit'in kanser (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD ve Wehi) ve normal hücre hatları (L929 ve Vero) üzerine hücre canlılığını azaltıcı etkisi MTT testi ile araştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda özellikle RD ve Wehi kanser hücre hatları üzerinde zamana (24-48-72 saat) ve konsantrasyonlara (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 µM) bağlı olarak usnik asit en etkili hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir.

Chen ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada usnik asit ile ilişkili otofajın rolünü araştırmıştır. Usnik asit kaspaz 3/7 aktivitesini ve subdiploid nükleus formasyonunu artırarak apoptoza neden olmakta ayrıca LC3B-I'in LC3B-II'ye dönüşümü ve P62'nin degradasyonu ile de otofajiye neden olmaktadır. Usnik asit çeşitli sinyal yolları ile ilişkili olması nedeniyle otofajinin indüklenmesi usnik asit bağımlı sitotoksiteye karşı korunma mekanizması olabileceği sonucuna varmışlardır. HepG2 hücreleri üzerinde usnik asit bağımlı sitotoksik etkiye bakmak için usnik asidin artan konsantrasyonlarını 2, 6, 24 ve 48 saat uygulamışlar ve MTT testi ile hücre canlılığın artan konsantrasyon ve zamana bağlı olarak azaldığını, LDH testi ile de 24 saat 12,5 µM konsantrasyonda ve 48 saat 3,13 µM konsantrasyonda usnik asit uygulamasında LDH seviyesinin artışını istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulmuşlardır. 2 saat ve 6 saat süreyle usnik asit uygulamasında ise önemli

bir LDH artışı görülmemiştir (1). Bizim çalışmamızda MTT testi sonuçlarına göre usnik asit kanser hücre hatlarının hepsinde (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD ve Wehi) zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız HepG2 hücre hattı üzerine en fazla hücre canlılığını azaltıcı etki 48 saat 100 µM usnik asit uygulanmasında gözlenmiştir. Ayrıca Singh ve arkadaşları usnik asit'in A549 hücrelerinde antikanser aktivitesini araştırmıştır. Usnik asidin 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır, doza ve zamana bağlı olarak hücre büyümesi ve proliferasyonu azalmıştır. Kontrol grubuna göre 100 µM 24 saat usnik asit uygulaması ölü hücrelerde iki kattan fazla artış göstermiştir. 48 saat usnik asit uygulamasında ise artış daha da fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 48 saat usnik asit uygulamasında doza bağlı olarak apoptotik etkide de bir artış meydana geldiği bulunmuştur (2). Gerçekleştirdiğimiz tez kapsamında, usnik asit farklı kanser hücre hatları üzerine 24, 48 ve 72 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. MTT testi sonuçlarına göre ticari ve doğal usnik asit sekonder metabolitleri uygulama süresine bağlı olarak çalışılan hücre hatları üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Özellikle 48 ve 72 saat 12.5 µM ve üzeri yüksek konsantrasyonlarda usnik asit uygulaması hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. Kanser hücre hatları üzerine canlı hücre yüzdesi 25 µM konsantrasyonda 48 saat ticari usnik asit uygulamasından sonraki konsantrasyon ve zamanda hücreler üzerine daha yüksek sitotoksik etki göstermektedir.

Einarsdottir ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada (+) ve (-) usnik asit enantiyomerlerinin T-47D ve Capan-2 hücre hattı üzerinde benzer proliferatif etki gösterdiğini bulmuşlardır. IC₅₀ değeri T-47D hücre hattı için (+) usnik asit 4,2 µg/ml, (-) usnik asit 4,0 µg/ml ve Capan-2 hücre hattı için (+) usnik asit 5,3 µg/ml, (-) usnik asit 5,0 µg/ml bulunmuştur. Böylece usnik asitin iki enantiyomerinde DNA sentezinin inhibisyonunda eşit ölçüde etkili olduğu bulunmuştur (107). Kristmundsdottir ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada ise Panc-1 hücre hattına karşılık usnik asitin EC₅₀ değeri 4,3 µg/ml, K-562 hücre hattına karşı 4,7 µg/ml, T-47D hücre hattına karşı 2,9 µg/ml ve PC-3 hücre hattına karşı EC₅₀ değeri 8,2 µg/ml olduğu bulunmuştur. Tüm test ettikleri hücre hatları üzerinde usnik asitin EC₅₀ değeri 4,3- 8,2 µg/ml konsantrasyonlarında aktif olduğu bulunmuştur (125). Ayrıca Kosanic ve arkadaşlarının (2013) *Evernia prunastri* ve *Pseudoevernia furfuracea* liken ekstratlarıyla yaptıkları çalışmada FemX ve LS174 hücre hatları üzerine en iyi sitotoksik aktivite gösteren physodik asit olmuştur. FemX ve LS174

hücre hatların karşı oldukça düşük IC₅₀ değerine (sırasıyla 19.52 ve 17.89 µg/ml) sahip olduğunu bulmuşlardır (126). Bizim çalışmamızda kullandığımız HepG2, Hep2C, RD, Wehi, L929 ve Vero hücre hatları üzerine usnik asidin EC₅₀ değerleri sırasıyla 65.7 µM, 43.6 µM, 45.8 µM, 31.7 µM, 30.2 µM ve 23.5 µM olarak bulunmuştur.

Bazin ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada usnik asidin (+) ve (-) enantiyomerlerinin L1210, 3LL, CRL-1642, K-562, CCL 243, DU145, MCF7, U251, U251, CHO ve CHO-MG hücre hatlarına karşı benzer aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ticari olarak ulaşımı daha kolay olduğu için (+) usnik asidi kullanmışlardır (127). Gerçekleştirilen tez çalışmasında doğadan topladığımız *Usnea diffracta* liken türünden izole ettiğimiz usnik asit'in hücre canlılığını üzerine etkisini belirleyip ticarileştirme amaçlı kullanılıp kullanılmayacağını belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda ticari usnik asit ile karşılaştırdığımızda benzer sitotoksik özellikler gösterdiğini belirledik. Bu nedenle Türkiye'den *Usnea diffracta* liken türünden izole ettiğimiz usnik asit sekonder metaboliti de ticarileştirilerek kullanılması mümkün gözükmektedir.

Brisdelli ve arkadaşlarının (2013) usnik asit, difraktik asit, lobarik asit, vikanisin, variolarik asit ve protolikesterinik asit ile yaptıkları çalışmada HeLa ve HCT-116 hücreleri üzerine yaygın hücre canlılığını azaltıcı aktivitesinin 25-100 µM konsantrasyon aralığında olduğu bulunmuştur. Çalışmada usnik asit en yüksek sitotoksik aktiviteyi MCF-7, HeLa ve HCT-116 hücreleri üzerine göstermiştir (128). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise ticari ve doğal usnik asit uygulanan hücre hatları üzerinde en fazla sitotoksik aktivite RD ve Wehi hücre hattı üzerinde gözlenmiştir.

Backorova ve arkadaşlarının (2011) liken sekonder metabolitleri olan Parietin, Atranorin, Gyrophorik asit ve Usnik asit'in farklı insan kanser hücreleri (A2780, HeLa, MCF-7, SK-BR-3, HT-29, HCT-116 p53^{+/+}, HCT-116 p53^{-/-}, HL-60 ve Jurkat) üzerine olan etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada usnik asit sekonder metabolitinin parietin ve gyrophorik aside göre hücre ölümünde daha geniş bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca usnik asidin 50 µM konsantrasyonda uygulanması HeLa ve HCT-116 p53^{+/+} hücre hatları hariç diğer tüm hücre hatlarında en etkili doz olarak belirtilmiştir (129). Çalışmamızda usnik asidin 48 saat 25 µM konsantrasyonda uygulanması HepG2 hücre hattı hariç çalışılan diğer tüm kanser hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur.

Dias ve Urban'ın (2009) gerçekleştirdikleri çalışmada doğal usnik asit'in 100 µM ve 200 µM konsantrasyonları önemli antitümör ve antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Parietin ve antranorin'inde içinde bulunduğu diğer liken sekonder metabolitleriyle karşılaştırıldığında usnik asit en yüksek antitümör ve antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (130). Bizim çalışmamızda da ilk hedefimiz farklı sekonder metabolitler yerine ticari olarak satılan usnik asit ile tarafımızca doğadan toplanmış *Usnea diffracta* liken türünden izole edilmiş usnik asit'in hücre canlılığı üzerine etkisini karşılaştırmaktır. Çalışma sonucunda doğal usnik asit'in ticari olarak alınmış usnik asit'e yakın hücre canlılığını azaltıcı etkiye sahip olduğunu ve 50 µM ve 25 µM konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak tüm hücre hatları üzerinde yüksek oranda hücre canlılığını azaltıcı etki gösterdiği bulunmuştur.

Koparal ve arkadaşları (2006) (+) usnik asit ve (-) usnik asit'in V79, A549 ve insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesini çalışmışlardır. (+) usnik asit (100 µg/ml) ve (-) usnik asidin (100 ve 50 µg/ml) yüksek konsantrasyonları insan lenfositleri üzerinde nekrotik hücrelerin sayısını artırarak sitotoksititeyi arttırmıştır. Apoptotik hücrelerde önemli bir artış 25 ve 30 µg/ml (-) usnik asit ile 50 µg/ml (+) usnik asit konsantrasyonlarında bulunmuştur. MTT sonuçlarına göre (+) usnik asit göreceli olarak A549 hücrelerine (-) usnik asit'ten daha sitotoksik etki göstermiştir. Usnik asidin iki enantiyomeride düşük dozlarda bile sağlıklı hücrelere kıyasla kanserli hücrelerin ölümünde ve kontrolünde daha etkili olduğu tespit edilmiştir (131). Çalıştığımız L929 ve Vero hücre hatları üzerine usnik asit uygulaması kanser hücrelerine kıyasla daha az sitotoksik etki göstermiştir. Normal hücre üzerine usnik asitin etkisinin çok düşük oranlarda olduğu hem MTT testi ile hem de qRT-PCR ile mRNA seviyesinde de doğrulanmıştır.

Manojlovic ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada *Parmelia caperata*, *P. saxatilis* ve *P. sulcata* likenlerinden elde ettikleri sekonder metabolitlerin antioksidant, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. FemX ve LS174 hücre hatları üzerinde salazinik asit ve protoketrarik asit liken sekonder bileşiklerinin güçlü antikanser aktivitesine sahip oldukları bulunmuştur. IC50 değerleri FemX hücre hattı için salazinik asit 39.02 ± 0.56 µg/ml, protoketrarik asit 58.68 ± 2.11 µg/ml ve usnik asit 12.72 ± 0.35 µg/ml, LS174 hücre hattı için salazinik asit 335.67 ± 1.89 µg/ml, protoketrarik asit 60.18 ± 0.59 µg/ml ve usnik asit 15.66 ± 1.45 µg/ml olarak bulunmuştur. En fazla sitotoksik etkiyi salazinik asit'in

gösterdiği belirtilmiştir. Salazininik asit protoketarik asite göre daha güçlü antioksidant aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (132). Ayrıca Kosanic ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışmada *Cladonia furcata*, *Cladonia pyxidata* ve *Cladonia rangiferina* likenlerinin ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri in vitro olarak araştırılmıştır. En güçlü sitotoksik aktiviteyi *C. rangiferina* ekstraktı sergilemiştir. IC50 değeri FemX ve LS174 hücre hatlarına karşı sırasıyla 19.97 µg/ml ve 10.97 µg/ml'dir (133). Bizim çalışmamızda ise usnik asit'in kullandığımız kanserli hücre hatları (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD ve Wehi) için EC50 değerleri 14.1 µM ile 65.7 µM arasında olduğu tespit edilmiştir.

6.1.2. USNİK ASİT UYGULAMASI SONRASI ÇALIŞILAN HÜCRE HATLARI ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİNİN qRT-PCR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Liken sekonder metabolitlerinden biri olan usnik asit'in kanserli ve normal hücrelere olan hücre canlılığı üzerine etkisinin mRNA boyutunda qRT-PCR ile değerlendirilmesi ilk defa gerçekleştirdiğimiz tez kapsamında literatürde yer alacaktır.

Han ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada usnik asit'in güçlü bir hepatotoksik ajan olduğunu bulmuşlardır. Usnik asit oksidatif stresi tetiklemektedir ve hücredeki normal metabolik işleyişi bozmaktadır. Usnik asidin 5 µM konsantrasyonu fare hematosit primer kültürüne uygulanması sonucunda 16 saat içinde %98 nekroz gerçekleşmiştir (134). Çalışmamızda usnik asit RD, Hep2C ve Wehi kanser hücre hatları üzerinde apoptoza neden olurken Vero normal hücre hattı üzerinde apoptoza neden olmadığı antiapoptotik Bcl-2 geninin, proapoptotik Bax geninin ve tumor supresor TP53 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Proapoptotik gen olan Bax geninin seviyesinde azalma meydana gelmesine karşılık MTT testi sonuçlarına göre hücre canlılığında azalmanın olması apoptoz mekanizmasının yanında nekroz gibi diğer hücre ölüm mekanizmalarının da meydana gelebileceğini akıllara getirmektedir. Bu doğrultuda ileri moleküler teknikler ile daha detaylı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Backorova ve arkadaşları (2012) farklı liken sekonder metabolitlerinin HT-29 ve A2780 insan hücre hatları üzerinde apoptotik etkisine bakmıştır. Usnik asit ve atranorinin, parietin ve gyrophorik asit ile karşılaştırıldığında daha etkili antikanser aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Usnik asidin 50 µM ve 100 µM konsantrasyonları bu hücre hatları üzerine 24

saat ve daha uzun süre uygulandığında Anneksin V pozitif hücrelerin sayısında önemli bir artış meydana gelmektedir. PARB, p53, Bcl-2/Bcl-xL, Bax, p38 ve pp38 proteinlerinin ekspresyonunun tespiti ile usnik asit ve atranorinin A2780 ve HT-29 hücrelerinde programlı hücre ölümünün aktivatörleri oldukları bulunmuştur (109). Ayrıca Song ve arkadaşlarının (2012) usnik asit liken sekonder metaboliti ile yaptıkları çalışmada usnik asit'in korneal neovaskülarizasyonu baskıladığı tespit edilmiştir. Çalışmada usnik asit'in VEGF-bağımlı fare kornea angiogenezini önemli ölçüde baskılamakta olduğu gösterilmiştir (111). Angiyogenez tümör büyümesinde ve metastazın tümör için gerekli oksijen ve besini sağlamada anahtar rol oynamaktadır (135). Usnik asit endotel hücrelerinde endotel büyüme faktör reseptörü (VEGFR) 2 aracılı ekstraselüler sinyal düzenleyici protein kinaz 1, 2 (ERK1/2) ve AKT/P70S6K sinyal yollarını bloke etmiştir. Böylece fare xenograft meme tumor modelinde usnik asit angiogenezi baskılayarak tumor gelişimini engellemektedir. Ayrıca yapmış oldukları in vitro çalışmada usnik asit'in endotel hücre proliferasyonunu ve tüp formasyonunun oluşturulmasını önemli ölçüde inhibe etmesinin yanında endotel hücrelerde morfolojik değişikliğe ve apoptoze neden olduğu bulunmuştur (111). BAX, BCL ve TP53 genleri ile yaptığımız çalışma da kullanılan kanser hücre hatları üzerine usnik asit apoptotik etki göstermektedir. Usnik asit uygulaması sonrasında diğer hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında BAX, BCL ve TP53 genlerinin ifadesinde en fazla azalma kontrol grubuna kıyasla 0.95 katlık bir azalma ile Wehi hücre hattında meydana geldiği için en fazla apoptotik etkide bu kanserli hücre hattında olduğu belirlenmiştir.

Wang ve arkadaşları (2015) çalışmalarında akciğer, rektal, kolon, gastrik, özefagal ve meme tumor örneklerinde yaygın kullanılan beş referans geni (ACTB, GAPDH, RPLPO, GUSB,TFRC) ve antikanser ilişkili on genin (TYMS, RRM1, TUBB3, STMN1, TOP2A, EGFR, VEGFR2, HER2, ERCC1 ve BRCA1) qRT-PCR analizini yapmıştır. HER2 hariç test edilen genlerin çoğu akciğer, rektal ve kolon tumorlerinde yüksek ekspresyon seviyelerinde görülmüştür. Ayrıca meme, gastrik ve özefagal tümörlerde düşük ekspresyon seviyesi gösterilmiştir. HER2 ekspresyon seviyesi en yüksek meme tümöründe, en düşük ise özefagal tümörlerdedir. Ayrıca diğer tümörler arasında akciğer kanserleri en yüksek EGFR ekspresyon seviyesine sahiptir. En düşük EGFR ekspresyon seviyesi ise meme tümöründe olduğunu gösterilmiştir (136). Gerçekleştirilen tez çalışmasında BAX, BCL ve TP53 gen ekspresyon seviyeleri kanser hücre hatları (Hep2C, RD, Wehi, L929 ve Vero) ile normal hücrelerde (L929 ve Vero) araştırılmış ve sonuçlara göre normal hücre hatları içerisinde

Vero hücre hattında BAX, BCL ve TP53 gen ekspresyon seviyeleri en yüksek iken kanser hücre hatları içerisinde ise RD hücrelerinde BAX ve TP53 gen ekspresyon seviyeleri en yüksek bulunmuştur. Ayrıca Wehi hücre hattında çalıştığımız tüm gen ekspresyon seviyeleri düşük bulunmuştur.

6.2. SONUÇ

Bu çalışma sonucunda;

- Doğal usnik asit ile ticari olarak satın alınan usnik asit'in kullanım etkinliğinin hücre canlılığı üzerine benzer sonuçlar elde edilmesi tarafımızca doğadan toplanmış doğal liken örneğinden izole edilen doğal usnik asit'in ticarileştirilebileliğini göstermektedir.
- Ticari olarak satın alınan ve doğal ortamından toplanan liken örneğinden izole usnik asit sekonder metabolitinin daha önce hiç incelenmemiş olan hücre hatları (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD, Wehi, L929 ve Vero) üzerine hücre canlılığına olan etkisi araştırılmıştır. Normal hücre hatları (L929 ve Vero) üzerine liken sekonder metaboliti olan usnik asit'in uygulanması canlı hücre yüzdesinde önemli bir azalmaya neden olmazken artan konsantrasyon ve zamana bağlı olarak usnik asit uygulaması kanser hücre hatları (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD ve Wehi) üzerinde önemli oranda canlı hücre yüzdesinde azalma meydana getirmiştir. Özellikle 6.25 ve 12.5 µM konsantrasyonlarında usnik asit uygulaması kanserli hücre hatları üzerine önemli sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.
- Usnik asit sekonder metaboliti çalışılan hücre hatları üzerinde en yüksek hücre canlılığı üzerine azaltıcı etkiyi RD ve Wehi hücre hatlarında gösterdiği bulunmuştur.
- mRNA boyutunda apoptoz ile ilişkili genlerin usnik asit sekonder metabolitinin uygulanmasından sonraki ifade değişimlerinde azalma meydana geldiği ve usnik asit'in apoptotik etkisi moleküler boyutta gösterilmiştir. Çalışılan hücre hatları içerisinde bu genlerin ifadelerinde azalma en fazla Wehi hücre hattında meydana geldiği gösterilmiştir.
- Elde edilen bulgular usnik asit liken sekonder metabolitinin kanser tedavisinde umut verici ilaç aday molekülü olabileceği gösterilmiştir.

Liken türlerinin ve bunların sekonder metabolitlerinin antikanser aktivitesi altında yatan moleküler mekanizmaları ortaya çıkarmak için daha detaylı çalışmalar gereklidir.



7. KAYNAKLAR

1. Chen S, Dobrovolsky VN, Liu F, Wu Y, Zhang Z, Mei N, Guo L. The role of autophagy in usnic acid-induced toxicity in hepatic cells. *Toxicol Sci.* 2014;142(1):33-44.
2. Singh N, Nambiar D, Kale RK, Singh RP. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutr Cancer.* 2013;65 Suppl 1:36-43.
3. Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften,* 1999;86:559-570.
4. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. *Springer Verlag,* Berlin, 1996;228–229.
5. Ingolfssdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry.* 2002;61:729-736.
6. Shibata S, Ukita T. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and its derivatives. *Jpn. J. Med.* 1948;1:152.
7. Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R, Villa P, Malecore M, Mancuso S. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as postsurgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. *Minerva Ginecol.* 1999;51:255.
8. Odabaşoğlu F, Çakır A, Süleyman H, Aslan A, Bayır Y, Halıcı M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of ethnopharmacology.* 2006;103(1):59-65.
9. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.* 1995;61:113.
10. Yamamoto R, Miyase T, Ueno A. Stachys saponins I–VIII, new oleananetype triterpene saponins from *Stachys riederi* Chamisso. *Chemical and Pharmacological Bulletin.* 1994;42:1291-1296.
11. Kumar S, Muller K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J. Nat. Prod.* 1999;62:821-823.
12. Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N, Phrukudom S, Ruangrunsi N.

- Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;90:381-387
13. Odabaşoğlu F, Aslan A, akır A, Suleyman H, Karagoz Y, Halıcı M. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytotherapy Research*. 2004;18(11):938-941.
 14. Otsuka H, Komiya T, Tsukumi M, Toyosato T, Fujimura H. Studies on anti-inflammatory drugs. Anti-inflammatory activity of crude drugs and plants (II). *J. Takeda Res. Lab*. 1972;31:247.
 15. Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, deAndradeLeite SR, Micheletti AC, Lopes TIB, Misutsu MY, Beatriz A, Brum RL, Leite CQF. Anti mycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine*. 2010;17:328-332.
 16. etin D, Cansaran D. Türkiye’de bulunan farklı liken turlerinin usnik asit miktarlarının yüksek basınlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmesi. *Sakarya niv Fen Blm Enst Derg*. 2006;8(2):23-31.
 17. Cansaran D, etin D, Halıcı GM, Atakol O. Determination of usnic acid in some rhizoplaca species from the middle anatolia and their antimicrobial activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2006;61(1-2):47-51.
 18. Cansaran D, Kahya D, Yurdakulol E, Atakol O. Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of anatolia and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2006;61c:773-76.
 19. Cansaran-Duman D. Farklı liken rneklerindeki usnik asit miktarlarının yüksek basınlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmesi ve antimikrobiyal aktiviteleri. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2007;64(3):17-21.
 20. Cansaran D, Atakol O, Halıcı MG, AksoyA. HPLC analysis of the usnic acid in some ramalina species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities. *Pharma Biol*. 2007;45-1:77-81.
 21. Cansaran-Duman D, Aras S, Atakol O. Determination of usnic acid content in some lichen species found in Anatolia. *J Appl Biol Sci*. 2008;2(3):41-4.
 22. Cansaran-Duman D. Türkiye’de bazı liken türlerindeki usnik asitin HPLC yöntemi ile değerlendirilmesi ve antimikrobiyal aktiviteleri. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2010;66:4:153-60.

23. Cansaran-Duman D, Çetin D, Şimsek H, Çoplu N. Antimicrobial Activities of the Lichens *Hypogymnia vittata*, *Hypogymnia physodes* and *Hypogymnia tubulosa* and HPLC Analysis of their Usnic Acid Content. *Asian J Chem*. 2010;22:8:6125-32.
24. Cansaran-Duman D, Halıcı MG. Antimicrobial activity of usnic acid on *Squamaria lentigera* lichen species. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2012;69:3:127-34.
25. Kutluk T, Kars A. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. *Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları*, Ankara, 1994;26.
26. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell, 4th edition. New York: *Garland Science*. 2002.
27. Renan MJ, How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*. 1993;7(3):139-46.
28. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*. 1999;12:53-6.
29. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
30. Doğan LA, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmalar ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2004;35:34-42.
31. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer, The Next Generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
32. Globocan, 2015. <http://globocan.iarc.fr>.
33. Bora-Başara B, Güler C, Yentür GK. Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü, *Sağlık Bakanlığı*, Ankara, 2014.
34. Çevik Ö, Aydın U, Gürsoy RN. Kanser Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2012;32(1):67-90.
35. Hart IR, Souhami RL, Tannock I, Hohenberger P, Horiot JC. Metastasis. Oxford Textbook of Oncology Second Edition, *Oxford University Press*, New York, 2002;1: 103.
36. Anonim-1, Radiation therapy, http://en.wikipedia.org/wiki/Radiation_therapy
37. Kaş HS, Eldem T, Gürsoy A. Kontrollü Salım Sistemlerinin Hedeflendirilmesi. *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, İstanbul, 2002;308.
38. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharm. Res*. 2010;27:950-961.

39. Leone LM, Roberts SC. In *Natural Products and Cancer Drug Discovery*. Springer. 2013;193-211.
40. Kaplan LD, Deitcher SR, Silverman JA, Morgan G. Phase II study of vincristine sulfate liposome injection (Marqibo) and rituximab for patients with relapsed and refractory diffuse large B-Cell lymphoma or mantle cell lymphoma in need of palliative therapy. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2014;14:37-42.
41. Von-Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Taberner J, Hidalgo M, Van-Cutsem DE, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med*. 2013;369:1691-1703.
42. Beranova L, Pombinho AR, Spegarova J, Koc M, Klanova M, Molinsky J, Klener P, Bartunek P, Andera L. The plant alkaloid and anti-leukemia drug homoharringtonine sensitizes resistant human colorectal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via multiple mechanisms. *Apoptosis*. 2013;18:739-750.
43. Kim JH, Chae M, Kim WK, Kim YJ, Kang HS, Kim HS, Yoon S. Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein. *Br. J. Pharmacol*. 2011;162:773-784.
44. Venditto VJ, Simanek EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature. *Mol. Pharm*. 2010;7:307-349.
45. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol*. 2010;28:3271-3277.
46. Biswas K. Common medicinal plants of Darjeeling and the Sikkim-Himalayas. *Sony Reprints Agency*, New Delhi, 1956;90.
47. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin; Springer, 1996;304-49.
48. Mork CN, Faller DV, Spanjaard RA. Loss of putative tumor suppressor E124/PIG8 confers resistance to etoposide. *FEBS Letters*, 2007;581:5440-5444.

49. Turan N. Nerium oleander Bitkisinin, Kök, Yaprak ve Gövde Ekstrelerinin Lösemi Hücrelerine Sitotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, *İstanbul Üniversitesi*, İstanbul. 2003.
50. Lee K. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. *Journal of Biomedical Science*. 1999;6:236-250.
51. El-Shazly MM, El-Zayat EM, Hermersdörfer H. Insecticidal activity, mammalian cytotoxicity and mutagenicity of an ethanolic extract from Nerium oleander (Apocynaceae). *Ann. Appl. Biol.* 2000;136:153-157.
52. Zhao Q, Li B, Weber N, Lou Y, Proksch P. Estrogen-like effects of ethanol extracts from several Chinese legumens on MCF-7. *Cell*. 2005;221:828-833.
53. Pathak S, Multani AS, Narayan S, Kumar V, Newman RA. Anvirzel, an extract of Nerium oleander, induces cell death in human but non murine cancer cell. *Anti Cancer Drugs*. 2000;11:455-463.
54. Wang X, Plomley JB, Newman R, Cisneros A. LC/MS/MS analysis of an oleander extract for cancer treatment. *Anal. Chem*. 2000;72:3547-3552.
55. Mc Conkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, Newman RA. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen independent, Metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Research*. 2000;60(14):3807-3812.
56. Hayashi K, Nagamatsu T, Ito M, Hattori T, Suzuki Y. Acotoside, a component of Stachys sieboldii MIQ, may be a promising antinephritic agent. Effects of acetoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*. 1994;(65):143–151.
57. Skaltsa HD, Bermejo P, Lazari DM, Silvan AM, Skaltsounis AL, Sanz A, Abad MJ. Inhibition of prostaglandin E2 and leukotriene C4 in Mouse peritoneal macrophages and thromboxan B2 production in human platelets by flavonoids from Stachys chrysantha and Stachys candida. *Biological and Pharmacological Bulletin*. 2000;(23):47-53.
58. Maleki N, Garjani A, Nazemiyah H, Nilfouroushan N, Eftekhar Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of Stachys inflata on rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;(75):213–218.

59. Takeda H, Ikeda YA. Model for the origin of basaltic achondrites based on the Ysmysy 7308 howardite. *J. Geophys Res. Suppl.* 1995;90:C649-663.
60. Afag F, Saleem M, Aziz MH, Mukhtar H. Inhibition of 12 tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by olenadrin. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2004;195:361-369.
61. Pietsch J, Oertel R, Trautman S, Schulz K, Kopp B, Dressler J. A non fatal oleander poisoning. *Int J Legal Med.* 2005;119:236-240.
62. Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M. Endophytic fungus from Nerium oleander L (Apocynaceae): Main constituent and antioxidant activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007;23:1253-1263.
63. Sreenivasan Y, Rafhavendra PB, Manna SK. Oleandrin- Mediated expression of fas potentiates apoptosis in tumor cells. *Journal of Clinical Immunology.* 2006;26(4):308-310.
64. Kupchan SM, Kopperman HL. L–usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia.* 1975;31:625.
65. Takai M, Uehara Y, Beisler JA. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *J. Med. Chem.* 1979;22:1380–1384.
66. Cardarelli M, Serino G, Campanella L, Ercole P, De Cicco Nardone F, Alesiani O, Rossiello F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *CMLS.* 1997;53:667–672.
67. Russo A, Piovano M, Lombardo L, Garbarino J, Cardile V. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sci.* 2008;83:468–474.
68. Ren MR, Hur JS, Kim JY, Park KW, Park SC, Seong CN, Jeong IY, Byun MW, Lee MK, Seo KI. Anti-proliferative effects of Lethariella zahlbruckneri extracts in human HT-29 human colon cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 2009;47:2157–2162.
69. Özenoğlu S, Aydoğdu G, Dinçsoy AB, Taghidizaj AA, Derici K, Yılmaz E, Aras S, Cansaran-Duman D. Lichen sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2013;70(4):215-26.
70. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367–401.

71. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104:487–501.
72. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281:1305–8.
73. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:32401–10.
74. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:545–51.
75. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 2001;20:2122–33.
76. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in Bcell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005;106:3214–22.
77. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
78. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:647–56.
79. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001;29:684–8.
80. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312–1316.
81. Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*. 1999;274:8359–8362.
82. Rensatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 2001;98:14250–14255.

83. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*. 2003;11:529–541.
84. Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*. 1998;273:27084–27090.
85. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2003;10:76–100.
86. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circ Res*. 2004;95:957-970.
87. Ahmadjian V. The Lichen Symbiosis. *John Wiley & Sons*, New York, A.B.D. 1993.
88. Nash TH. Lichen biology. *Cambridge University Press*, Cambridge. 1997.
89. Nash III TH. Lichen Biology. *Cambridge University Press*, Cambridge. 1996.
90. Dobson FS. Lichens: An Illustrated Guide to the British and Irish Species. *The Richmond Publishing Co. Ltd.*, England. 2000.
91. Dayan FE, Romagni JG. Lichens As a Potential Source of Pesticides. *Pesticide Outlook*. 2001;12:229-232.
92. Stocker-Wörgötter E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*. 2008;25:188–200.
93. Lawrey JD. Biological role of lichen substances. *Bryologist*. 1986;89:11-122.
94. Hale ME. The biology of lichens, 3rd edn. *Edward Arnold*, London. 1983.
95. Brodo IM, Sharnoff SD, Sharnoff S. Lichens of North America. *Yale University Press*, New Haven & London. 2001;795.
96. Culberson WL. Chemosystematics and ecology of lichens-forming fungi. *Annual review of ecology and Systematics*. 1970;1:153-170.
97. Vartia KO. Antibiotics in lichens. In: The Lichens (Ahmadjian V. and Hale M. E., eds.), *Academic Press*, New York. 1973;547-561.
98. Güner H, Aysel V, Sukatar A. Tohumuz Bitkiler Sitematiği II (Mantarlar ve Likenler). *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova-İzmir. 1992;2(138):139-142.

99. Burkholder PR. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1944;30(9):250-255.
100. Lawrey JD. Lichen secondary compounds influence herbivore choice. *BioScience.* 1984;34:109.
101. Thadhani VM, Iqbal-Choudhary M, Sajjad A, Iman O, Hina S, Veranja K. Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Natural Product Research, Formerly Natural Product Letters.* 2011;25:19.
102. Kim H, Kim KK, Hur JS, Upreti DK. Anticancer Activity of Lichen Metabolites and Their Mechanisms at the Molecular Level. *Recent advances in Lichenology Springer, India.* 2015;11:201-208.
103. Budova J, Backor M, Backorova M, Zidzik J. Usnic acid and copper toxicity in aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici*. *Symbiosis.* 2006;42:169–174.
104. Bezivin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen *Cladonia convolute*. *Planta Med.* 2004;70:874–877.
105. Russo A, Piovano M, Lombardo L, Vanella L, Cardile V, Garbarino J. Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Anti-Cancer Drugs.* 2006;17:1163–1169.
106. Burlando B, Ranzato E, Volante A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med.* 2009;75:607–613.
107. Einarsdottir E, Groeneweg J, Björnsdottir GG. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med.* 2010;76(10):969-974.
108. Backorova M, Backor M, Mikes J, Jendzelovsky R, Fedorocko P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol. In Vitro.* 2011;25:37-44.
109. Backorova M, Jendzelovsky R, Kello M. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol. In Vitro.* 2012;26:462-468.
110. Jin JQ, Li CQ, He LC. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappa B-dependent tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase

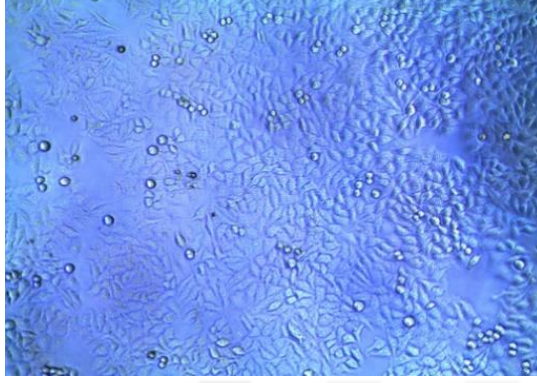
- expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phytother Res.* 2008;22:1605-1609.
111. Song Y, Dai F, Zhai D, Dong Y, Zhang J, Lu B, Luo J, Liu M, Yi Z. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2- mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis.* 2012;15:421-432.
 112. Wirth V. Die Flechten Baden-Württembergs. *Teil 12, Eugen Ulmer GmbH. Co.* Germany: 1995.
 113. Purvis WO, Coppins BJ, Hawksworth DL, James PW, Moore DM. The lichen flora of Great Britain and Ireland. *Natural History Museum Publications.* England. 1992.
 114. Feige GB, Lumbsch S, Huneck JA, Elix J. Identification of lichen substances by a standardized highperformance liquid chromatographic method. *J Chromatography.* 1993;646:417-427.
 115. Yoshimura I, Kinoshita Y, Yamamoto S, Huneck S and Yamada Y. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. *Phytochem Anal.* 1994;5:195-205.
 116. Kranner I, Beckett RP, Varma AK (Eds.) Protocols in Lichenology. *Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring.* Springer Verlag, Berlin. 2002.
 117. Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT [3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999;65/8:3727-3729.
 118. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
 119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative geneexpression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods.* 2001;25:402–408.
 120. Vousden K H. *Cell.* 2000;103:691–694.
 121. Oren M. *Cell Death Differ.* 2003;10:431–442.
 122. Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;774:609-619.

123. Meterissian SH, Kontogiannea M, Al-Sowaidi M, Linjawi A, Halwani F, Jamison B, Edwardes M. Bcl-2 is a useful prognostic marker in Duke's B colon cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2001;8(6):533–537.
124. Ramos D, Pellín-Carcelén A, Agustí J, Murgui A, Jordá E, Pellín A, Monteagudo C. Deregulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression during tumor progression of human cutaneous melanoma. *Anticancer Res.* 2015;Jan;35(1):439-44.
125. Kristmundsdóttir T, Jónsdóttir E, Helga M. Ögmundsdóttir HM, Ingólfssdóttir K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2005;24:539–543.
126. Kosanic M, Manojlovic N, Jankovic S, Stanojkovic T, Rankovic B. Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuracea lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem Toxicol.* 2013;Mar;53:112-8.
127. Bazin MA, Le Lamer AC, Delcros JG, Rouaud I, Uriac P, Boustie J, Corbel JC, Tomasi S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(14):6860-6.
128. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. *Phytotherapy Research.* 2013;27:431-437.
129. Backorova M, Backor M, Mikes J, Jendzelovsky R, Fedorocko P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol In Vitro.* 2011;Feb;25(1):37-44.
130. Dias DA, Urban S. Phytochemical investigation of the Australian lichens *Ramalina glaucescens* and *Xanthoria parietina*. *Nat Prod Commun.* 2009;Jul;4(7):959-64.
131. Koparal AT, Ayaz-Tüylü B, Türk H. In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (–)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters.* 2006;20.
132. Manojlovic N, Rankovic B, Kosanic M, Vasiljevic P, Stanojkovic T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine.* 2012;19(13):1166-72.

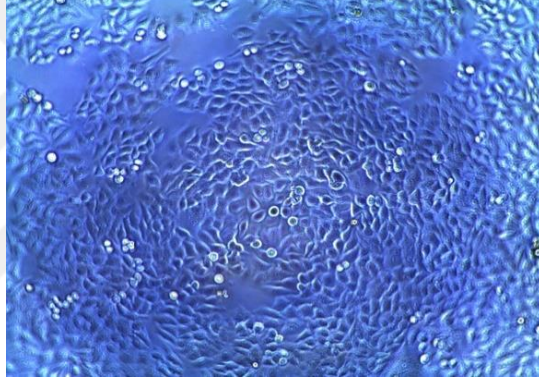
133. Kosanic M, Rankovic B, Stanojkovic T, Rancic A, Manojlovic N. Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT - Food Science and Technology*. 2014;59:518-525.
134. Han D, Matsumaru K, Rettori D, Kaplowitz N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(3):439-51.
135. Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(6):423–435.
136. Wang H, Yang B, Geng T, Li B, Dai P, Chen C. Tissue-specific selection of optimal reference genes for expression analysis of anti-cancer drug-related genes in tumor samples using quantitative real-time RT-PCR. *Exp Mol Pathol*. 2015;Jun;98(3):375-81.

8. EKLER

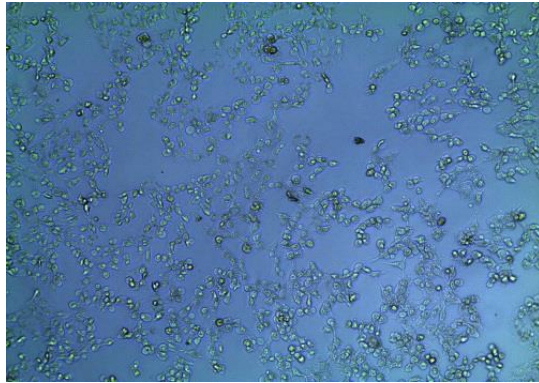
EK1. Hücre hatları üzerine usnik asit'in konsantrasyon ve zamana bağlı uygulama grntleri.



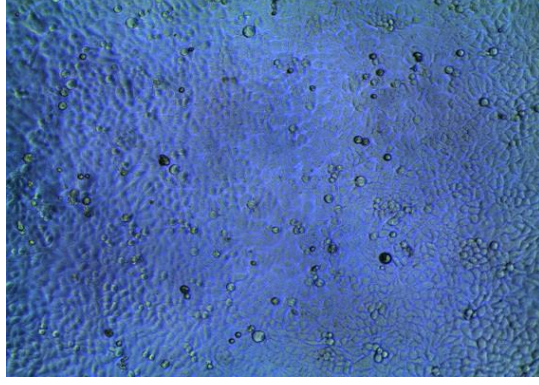
Şekil 8.1. Hep2C hücre hattı (6.25 µM Usnik asit uygulaması 24 saat sonrası).



Şekil 8.2. Hep2C hücre hattı (12.25 µM Usnik asit uygulaması 48 saat sonrası).



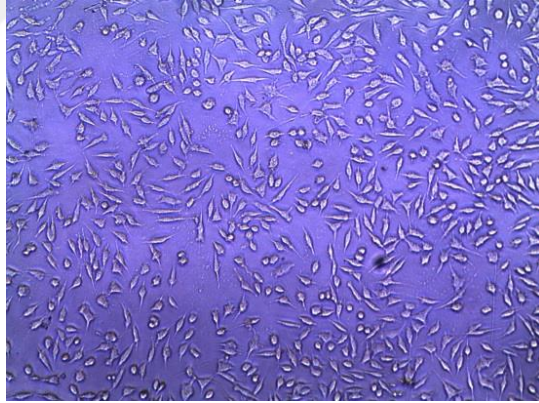
Şekil 8.3. Hep2C hücre hattı (50 µM Usnik asit uygulaması 72 saat sonrası).



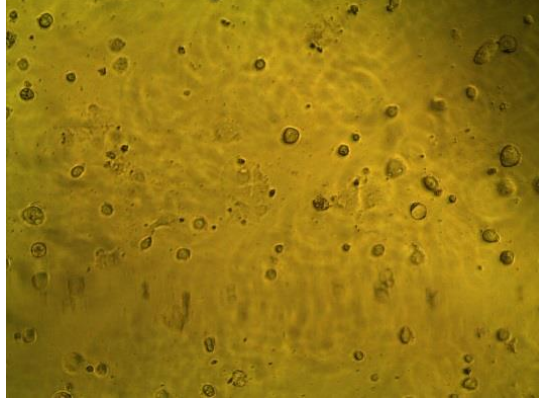
Şekil 8.4. Hep2C hücre hattı negatif kontrol (48 saat).



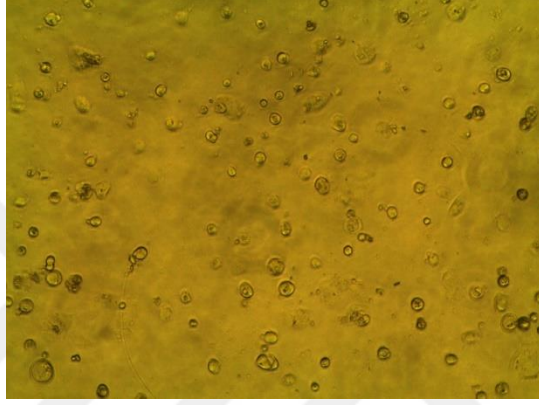
Şekil 8.5. L929 hücre hattı (400 µM Usnik asit uygulaması 48 saat sonrası).



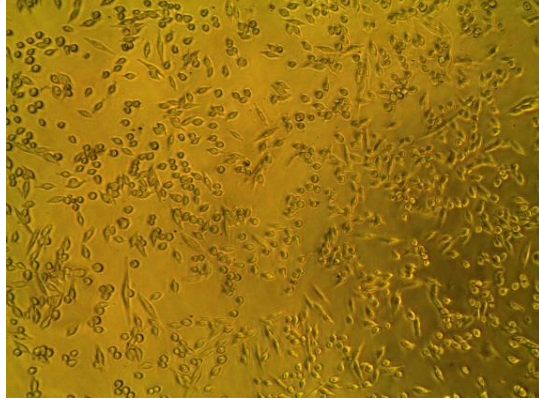
Şekil 8.6. L929 hücre hattı (DMSO kontrol-48 saat).



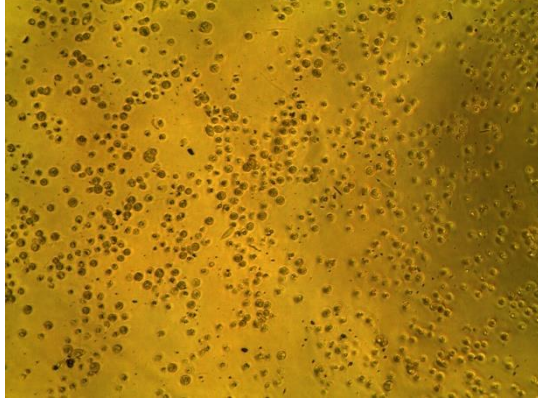
Şekil 8.7. Caco2 hücre hattına 6.25 μ M UA uygulanması (24 saat sonra).



Şekil 8.8. CaCo2 hücre hattına 100 μ M UA uygulanması (24 saat sonra).



Şekil 8.9. Wehi hücre hattına 50 μ M UA uygulanması (24 saat sonra).



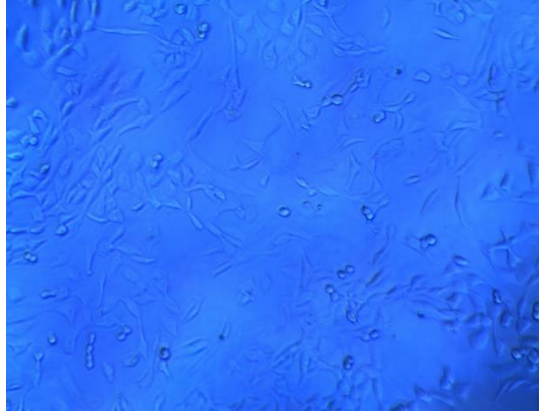
Şekil 8.10. Wehi hücre hattına 200 µM UA uygulanması (48 saat sonra).



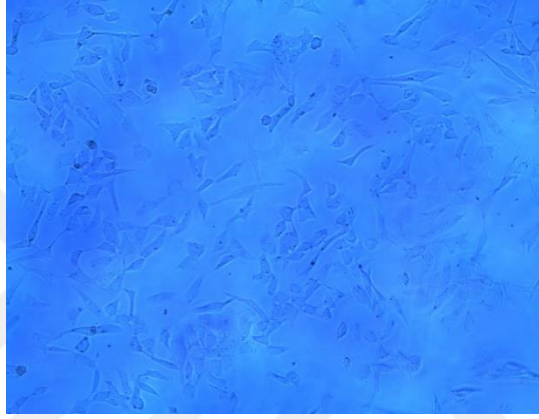
Şekil 8.11. Wehi hücre hattı pozitif kontrol (48 saat sonra).



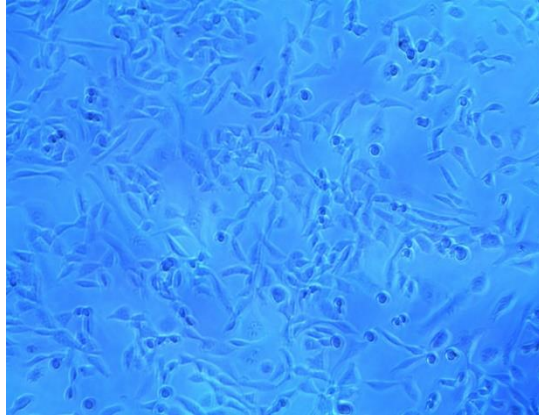
Şekil 8.12. Wehi hücre hattı negatif kontrol (48 saat sonra).



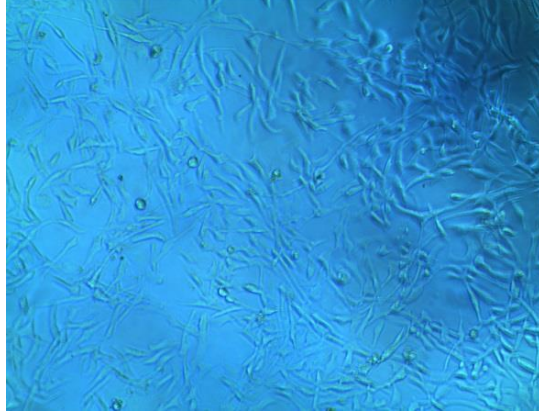
Şekil 8.13. RD hücre hattına 6.25 μ M UA uygulanması (24 saat sonra).



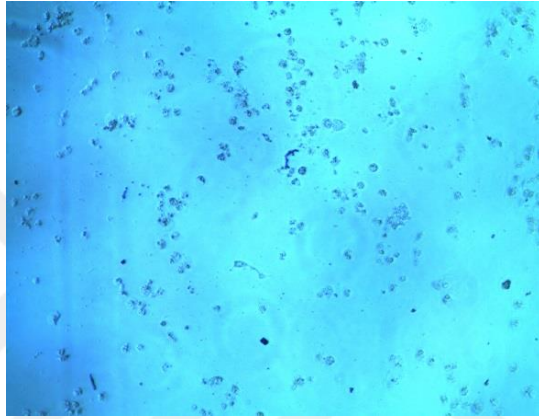
Şekil 8.14. RD hücre hattına 50 μ M UA uygulanması (24 saat sonra).



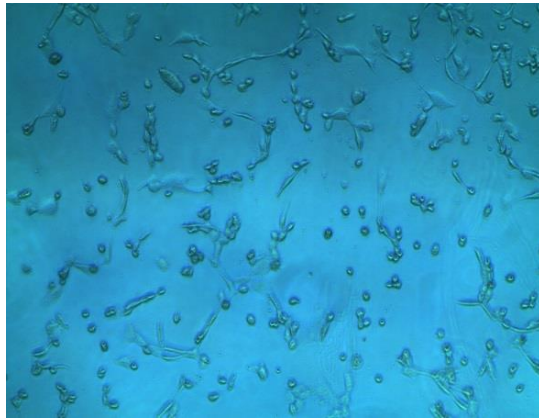
Şekil 8.15. RD hücre hattı negatif kontrol (24 saat sonra).



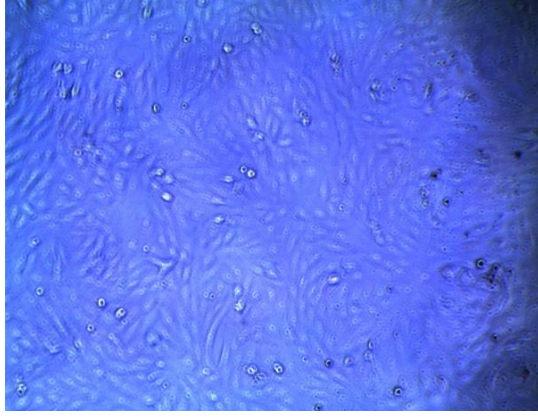
Şekil 8.16. RD hücre hattına 50 µM UA uygulanması (48 saat sonra).



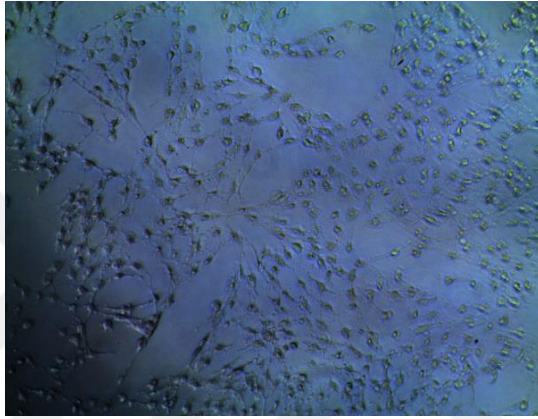
Şekil 8.17. RD hücre hattına 200 µM UA uygulanması (72 saat sonra).



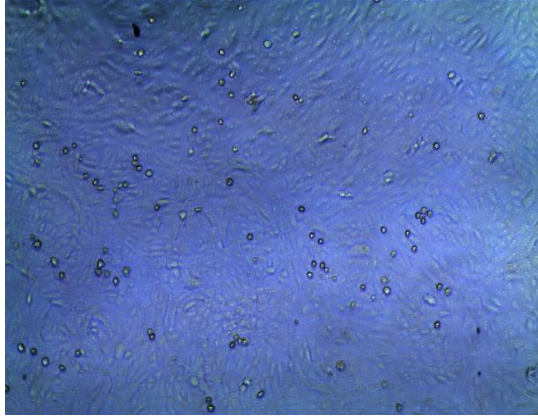
Şekil 8.18. RD hücre hattı pozitif kontrol (72 saat sonra).



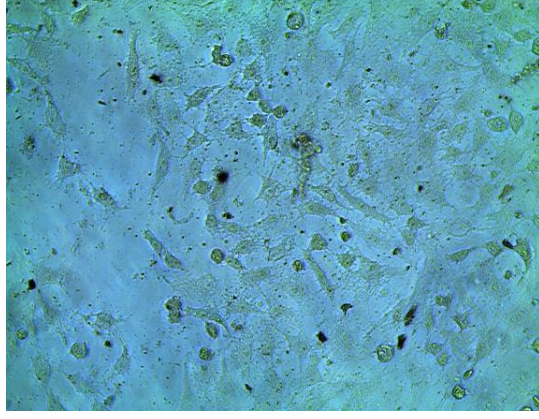
Şekil 8.19. Vero hücre hattına 25 µM UA uygulanması (24 saat sonra).



Şekil 8.20. Vero hücre hattına 100 µM UA uygulanması (72 saat sonra).



Şekil 8.21. Vero hücre hattı negatif kontrol (72 saat sonra).



Şekil 8.22. Vero hücre hattı pozitif kontrol (72 saat sonra).



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Adnan Berk Dinçsoy

Doğum Yeri: Altındağ

Doğum Tarihi: 16.04.1990

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Yahya Kemal Beyatlı Lisesi (2004-2007)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji (2007-2012)

Dil Eğitimi: ODTÜ Yabancı Dil Eğitimi (İngilizce 6 ay, 2013)

İş Tecrübesi

Kurumu: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Temel Tıp, Fizyoloji Anabilim Dalı

Görevi: Araştırma Görevlisi

Yılları: 2013-2014

Kurumu: Hacettepe Üniversitesi, Temel Tıp, Fizyoloji Anabilim Dalı

Görevi: Araştırma Görevlisi

Yılları: 2014-devam ediyor

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Özenoğlu S, Aydoğdu G, **Dinçsoy AB**, Taghidizaj AA, Derici K, Yılmaz E, Aras S, Cansaran-Duman D. Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Turk Hij Den Biyol Derg*, (2013), 70(4): 215-26. DOI: 10.5505/TurkHijyen.2013.37167.

Dinçsoy B., Soydam-Aydın S., Büzkaya H., Derici K., Aras S., and Cansaran-Duman D., Screen a usnic acid lichen seconder metabolite to determine their cytotoxic effects and mRNA expression level. *IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*. November 27 - 29, METU, Poster Sunumu.



Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi

Evaluation of the impact on different types of human cancer cell of lichen secondary compounds

Sinem ÖZENOĞLU¹, Gülizar AYDOĞDU², Adnan Berk DİNÇSOY³, Afşar Abbasi TAHDİZAJ¹,
Kürşat DERİÇİ¹, Erhan YILMAZ¹, Sümer ARAS², Demet CANSARAN-DUMAN³

ÖZET

Günümüzde kanser heriz çözümlenememiş önemli bir sağlık problemidir. Kanser tedavisinde temel olarak cerrahi, kemoterapi ve hormon tedavî yöntemleri kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan bu temel yöntemlerin ve ilaçların tedavide yetersiz olduğu düşünülmektedir. Bu tedavi yöntemleri bazı yan etkilere sahiptir ve tedaviler uzun sürmektedir. Son yıllarda kanser tedavisinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır. Bu amaç doğrultusunda son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerine karşı sentetik, bitkisel ve fungus kaynaklı ilaçların antikanser etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan bu araştırmalar sonucunda likenler ve sekonder metabolitlerinin de kanser tedavisinde çözüm olabilmeleri için alternatif bir yöntem olarak kullanılması önerilmiştir. Likenler; mantarların alglerle bir araya gelerek meydana geldikleri morfolojik ve fizyolojik birimler olarak tanımlanmaktadır. Bu metabolitler yağlı asitler ve laktonlar, zeorin grubu bileşikler, pulvik asit türevleri, kumaron türevleri, depolide, depolider ve antrokinon türevleri olarak sınıflandırılırlar. Son beş yıldır liken sekonder metabolitlerinin farklı kanser hücre tipleri üzerinde yapılan çalışmalar umut vericidir; ilaç aday molekülleri bulmayı hedeflemektedir.

Anahtar Kelimeler: Liken metabolitleri, kanser hücreleri, antikanserojenik etki

ABSTRACT

Today, cancer is appearing as a major unsolved health problem. Basically, surgery, chemotherapy and hormone therapy models are used in the treatment of cancer. Basic procedures and drugs used in the treatment of cancer are thought to be insufficient. These treatments have some side effects and they take a long time. Due to the problems encountered in the treatment of cancer in the recent years, alternative methods of treatment are being researched. For this purpose the effect of herbal, synthetic and fungus organisms against various types of cancer is being investigated. As a result of these investigations, lichens and their secondary metabolites are also proposed to be used as an alternative method in cancer treatment. Lichens are a symbiotic association of a fungus and a photosynthetic partner. These metabolites were identified as fatty acids, lactons, zeorin, pulvic acid, petroleum, depolide, depolider and antrokinon derivatives. Impact of lichen secondary compound studies on different human cancer types, aims to find a promising drug Candidate molecule.

Key Words: Lichen metabolites, cancer cells, anticancer activity

¹ Ankara Üniversitesi, Eyaletleraleji Enstitüsü, Marlıca Laboratuvarı, ANKARA

² Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Eyaletleraleji Enstitüsü, ANKARA

³ Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, İlaç, Eyaletleraleji Tıbbi Ürünler Laboratuvarı Dairesi, ANKARA



İletişim / Corresponding Author: Demet CANSARAN-DUMAN

Ankara Üniversitesi, Eyaletleraleji Enstitüsü, Marlıca Laboratuvarı, ANKARA

Tel : +90 312 233 68 30-330

E-posta / E-mail : dcansaran@yahoo.com

Gönderilme Tarihi / Received : 17.02.2013

Kabul Tarihi / Accepted : 19.03.2013

DOI ID : 10.1501/EnHıjyen_2013_17167

Öznoğlu S, Aydoğdu G, Dinçsoy AB, Tahdizaj AA, Derici K, Yılmaz E, Aras S, Cansaran-Duman D. Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. Türk Hıjyen Deneysel Biyol Derg. 2013; 70(4): 215-26.