

**USNİK ASİTİN KÜLTÜRÜ YAPILMIŞ HUVEC
VE ÜÇ FARKLI KANSER HÜCRE HATTI
(A549, HeLa ve AGS) ÜZERİNE SİTOTOKSİK,
ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Özel ÇAPIK

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Güleray AĞAR
2014**

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**USNİK ASİTİN KÜLTÜRÜ YAPILMIŞ HUVEC VE ÜÇ FARKLI
KANSER HÜCRE HATTI (A549, HeLa ve AGS) ÜZERİNE
SİTOTOKSİK, ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Özel ÇAPIK

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2014**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

USNİK ASİTİN KÜLTÜRÜ YAPILMIŞ HUVEC VE ÜÇ FARKLI KANSER
HÜCRE HATTI (A549, HeLa ve AGS) ÜZERİNE SİTOTOKSİK,
ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Özel ÇAPIK tarafından hazırlanan bu çalışma 25.12.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu ...31.../...12.../...2014... tarih ve ...52.../...1748... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

USNİK ASİTİN KÜLTÜRÜ YAPILMIŞ HUVEC VE ÜÇ FARKLI KANSER HÜCRE HATTI (A549, HeLa ve AGS) ÜZERİNE SİTOTOKSİK, ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Özel ÇAPIK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki usnik asitin HUVEC (İnsan Göbek Kordonu Damar Endotel Hücre), A549 (Akciğer Kanseri), HeLa (Rahim Ağzı Kanseri) ve AGS (Mide Kanseri) hücre hatları üzerine antiproliferatif ve sitotoksik etkisi LDH ve WST-1 metodları ile apoptotik etkisinin belirlenmesi ve DNA kırıklarının değerlendirilmesi ise TUNEL metodu ile tespit edildi. Ayrıca usnik asitin HUVEC hücreleri üzerindeki optimum konsantrasyon süresi xCELLigence – RT-CC (Real Time Cell Counter) sistemi ile hücrelerin elektrot direnci ölçülerek belirlendi. Sonuçlarımıza göre; usnik asitin HUVEC üzerine optimum konsantrasyon süresi 48. saat ve konsantrasyon miktarı ise 12,5, 25 ve 50 µM olarak tespit edildi. Usnik asitin A549 ve HeLa kanser hücre hatları üzerine antikanser etkisinin özellikle 12,5 ve 25 µM lık dozlarda olduğu fakat AGS kanser hücre hattı üzerine önemli derecede kanserojen etki göstermediği belirlendi. Ayrıca 25 µM lık usnik asitin üç farklı kanser hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin pozitif kontrolle (CCl₄) kıyaslanması durumunda A549 ve HeLa kanser hücre hattında önemli olduğu rapor edildi.

2014, 62 sayfa

Anahtar Kelimeler: Usnik Asit, RT-CC, LDH, WST-1, Tunel

ABSTRACT

Master Thesis

CYTOTOXIC, ANTI-PROLIFERATIVE AND APOPTOTIC DETERMINED EFFECTS OF *Usnic acid* ON CULTURED HUVEC AND DIFFERENT CANCER LINES

Özel ÇAPIK

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of Molecular Biology

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Güleray AGAR

In this study, antiproliferative and cytotoxic effects of usnic acid on HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell), A549 (human lung carcinoma), HeLa (human cervix carcinoma) and AGS (gastrik adeno Carsinoma) cancer cell lines at different concentrations were evaluated by using LDH and WST-1 assays. Besides, determination of its apoptotic effects and DNA fragmentations were done by TUNEL assay. Also, optimum concentration time of the usnic acid on HUVEC was determined as 48th hour and related consantration as 12.5, 25 and 50 μM via measuring cell electrode resistance with xCELLigence – RT-CC (Real-Time Cell Counter). Our results show that usnic acid do not have significant cytotoxic effect on HUVEC cells and inhibition was observed at 48th hour of the cell proliferation. Also anticancer effects of the usnic acid on cancer cell lines were observed in 12,5 and 25 μM concentrations to A549 and HeLa cell lines, but anticancer effects of the usnic acid on AGS cells weren't observed. In addition, it was reported that significant effects observed at 25 μM concentration on A549 and HeLa cancer cells when apoptotic effect of the usnic acid on three cancer cells were compared with positive control (CCl_4).

2014, 62 pages

Keywords: *Usnic acid*, RT-CC, LDH, WST-1, Tunel

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü çalışma olanağı sağlayan, sabrı, koşulsuz yardımları, sevgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olan ayrıca fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a;

Tezin hazırlanma sürecinde bana çalışma imkânı sunan ve fikirlerinden istifade ettiğim Sayın Doç. Dr. Lokman ALPSOY'a ve asistanı Sayın Zeynep ÜLKER'e;

Çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa ANAR ve Sayın Öğrtm. Gör. Emre KIZIL'a;

Ayrıca; eğitimim boyunca her aşamayı benimle beraber atlatan, sonsuz ve koşulsuz sevgilerini, emeklerini, sabırlarını, desteklerini ve tüm imkanları bana sunan, huzurlu ve sevgi dolu bir hayat sürmemi sağlayan değerli anneme, babama, Leyla ALTINTABAK'a, Şükran ÜNLÜKUL'a ve manevi olarak yanımda olduğunu hissettiğim beş yaşındaki yeğenim Nurullah Yiğit'e çok teşekkür ederim.

Özel ÇAPIK

Aralık, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	9
2.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hatları.....	9
2.1.1. İnsan göbük kordonu damar endotel hücreleri (Human Umbilical Vein Endothelial Cell -HUVECs).....	9
2.1.2. İnsan servikal kanser (Human Cervix Carcinoma-HeLa) hücre hattı.....	10
2.1.3. İnsan akciğer kanser (Human Lung Carcinoma-A549) hücre hattı.....	10
2.1.4. İnsan mide kanser (Gastrik Adeno Carcinoma-AGS) hücre hattı.....	10
2.2. RT-CC (Real-Time Cell Counter- Eş zamanlı Hücre Sayımı) Sistemi.....	11
2.3. LDH (Laktat Dehidrogenaz) Metodu.....	12
2.4. WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) Metodu.....	14
2.5. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidly Transferase dUTP Nick End Labelling) Metodu.....	16
3. MATERYAL ve METOD.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Genel olarak kullanılan kimyasallar.....	19
3.1.2. Genel olarak kullanılan cihazlar.....	20
3.2. Metodlar.....	21
3.2.1. Usnik asit solüsyonlarının hazırlanması.....	21
3.2.2. Hücre kültürü.....	21
3.2.2.a. HUVEC ve kanser hücre hatlarının kültür aşaması.....	21
3.2.3. Hücrelere usnik asitin eklenmesi.....	23
3.2.4. Eş zamanlı hücre sayımı (RT-CC) analizi.....	23

3.2.5. Sitotoksisite testi (LDH).....	24
3.2.6. Proliferasyon testi (WST-1)	25
3.2.7. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling)	26
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1. LDH ve WST-1 Testleri İçin Optimum Hücre Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	29
4.2. Sitotoksisite (LDH) ve Proliferasyon (WST-1) Testi Sonuçları	31
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	47
5.1. Öneriler.....	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μM	Mikro Molar
MA	Moleküler Ağırlığı
ml	mili litre
A549	Human Lung Carcinoma-İnsan Akciğer Kanseri Hücresi
AGS	Gastrik Adeno Carcinoma-Mide Kanseri Hücresi
CCl_4	Karbontetraklorat
DAPI	4',6- diamidino-2-fenylindole
DMSO	Dimetil Sülfat Oksit
FBS	Fetal Bovin Serum
HUVEC	Human Umbilikal Vein Endothelial Cell-İnsan Göbek Kordonu Damar Endotel Hücre
HeLa	Human Cervix Carcinoma- İnsan Serviks Kanseri Hücresi
LDH	Laktate Dehidrogenaz
NADPH	Yükseltgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PBS	Fosfat Buffer Salin
RPM	Revolutions Per Minute
RTCC	Real Time Cell Counter-Eş Zamanlı Hücre Sayımı
TdT	Terminal deoksinükleotid Transferaz
TUNEL	Terminal deoxynucleotid transferaz dUTP Nick End Labelling
US	Usnik Asit
WST-1	Water Soluble Tetrazolium
X-dUTPs	Deoksiuridin Trifosfat Nükleotidleri
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Usnik asitin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.1. RT-CC - xCELLigence sisteminin çalışma prensibi	12
Şekil 2.2. LDH Deney prensibi.....	13
Şekil 2.3. WST-1 Deney prensibi	15
Şekil 2.4. Mitokondride meydana gelen hasarın ardından WST-1'in oksitlenerek formazona dönüşmesi.....	16
Şekil 2.5. DNA da kırık oluşum mekanizması	17
Şekil 2.6. DNA da meydana gelen kırıkların sinyal oluşturma mekanizması	18
Şekil 3.1. Hemositometreyle hücre sayım aşaması.....	22
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyondaki usnik asidin seyreltilme işlemi	23
Şekil 3.3. E-platedeki herbir kuyucuğun hücreyi algılama sistemi	24
Şekil 3.4. LDH ve WST-1 deneylerinin uygulama aşaması	26
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki usnik asitin HUVEC üzerine etkisi	30
Şekil 4.2. Usnik asitin 24. Saatte HUVEC üzerine etkisinin mikroskop görüntüsü (x10)	30
Şekil 4.3. Usnik asitin 48. Saatte HUVEC üzerine etkisinin mikroskop görüntüsü (x10)	31
Şekil 4.4. Usnik asitin 5 farklı konsantrasyonunun HUVEC üzerine sitotoksik ve proliferatif etkisi	33
Şekil 4.5. 5 farklı konsantrasyondaki usnik asitin A549 kanser hücre hattı üzerine olan antikanser etkisi	35
Şekil 4.6. 5 farklı konsantrasyondaki usnik asitin, HeLa kanser hücre hattı üzerine olan antikanser etkisi.	35
Şekil 4.7. 5 farklı konsantrasyondaki usnik asitin, AGS kanser hücre hattı üzerine olan antikanser etkisi.	36
Şekil 4.8. A549 kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki negatif kontrol görüntüsü (x40).	37
Şekil 4.9. A549 kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki pozitif kontrol (CCI4) görüntüsü (x40).	38

Şekil 4.10. A549 kanser hücrelerinin usnik asit ile muamelesi sonucu invert mikroskoptaki görüntüsü (x40).	39
Şekil 4.11. AGS kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki negatif kontrol görüntüsü (x40).	40
Şekil 4.12. AGS kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki pozitif kontrol (CCl ₄) görüntüsü (x40).	41
Şekil 4.13. AGS kanser hücrelerinin usnik asit ile muamelesi sonucu invert mikroskoptaki görüntüsü (x40).	42
Şekil 4.14. HeLa kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki negatif kontrol görüntüsü (x40).	43
Şekil 4.15. HeLa kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki pozitif kontrol (CCl ₄) görüntüsü (x40).	44
Şekil 4.16. HeLa kanser hücrelerinin usnik asit ile muamelesi sonucu invert mikroskoptaki görüntüsü (x40).	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Genel olarak kullanılan kimyasalların listesi.....	19
Çizelge 3.2. Genel olarak kullanılan cihazların listesi ve modeller.....	20
Çizelge 4.1. HUVEC ve üç farklı kanser hücre hattında usnik asitin Sitotoksisite (LDH) ve Proliferasyon (WST-1) üzerine olan etkilerine ait varyans analiz sonuçları	32
Çizelge 4.2. Usnik asidin farklı konsantrasyonlarının sitotoksisite üzerindeki etkisi	33
Çizelge 4.3. Usnik asidin farklı konsantrasyonlarının proliferasyon üzerindeki etkisi ..	34
Çizelge 4.4. 25 µM konsantrasyondaki usnik asitin A549, AGS ve HeLa kanser hattları üzerine apoptotik etkisinin istatistiksel sonucu	46

1. GİRİŞ

Liken tabiri ilk kez M.Ö. IV yüzyılda Yunan bilim adamı Theophrastus tarafından kullanılmıştır. Daha sonraları liken olarak tarif edilen bu bitkilerin liken olmayıp “ciğer otları” için kullanıldığı anlaşılmıştır. Tek bir bitki olduğu düşünülen likenler sonraları Schwender ve Trebox’un yaptığı çalışmalarla bir mikobiyont olan mantar ile bir ya da daha fazla sayıda alg veya siyanobakter olabilen fotosentetik fotobiyont ortak ile oluşan simbiyotik canlılar olarak tanımlanmıştır (Nash and Thomas 1996).

Liken birlikteliğinde, klorofilleri olmadığı için fotosentez yapamayan mantar, alge ev sahipliği yaparak fotosentetik ürünleri elde etmiş olur. Alg ise fotosentez için gerekli olan mineral ve su gibi maddeleri mantardan almasının yanı sıra, yüksek sıcaklık, zararlı ışınlar ve yüksek nem gibi olumsuz durumlara karşı mantar tarafından korunur. Likeni oluşturan mantar, bu birliktelikten daha fazla yarar sağlar. Alg ise serbest yaşayan formlarına göre daha zayıf gelişir. Bu nedenle günümüzde, liken birliğinin mutualizmden ziyade kontrollü parazitizm örneği olduğu kabul edilmektedir (Ahmadjian 1993; Nash and Thomas 1996; Dobson 2000; Dayan and Romagni 2001; Cocchietto *et al.* 2002). Oluşturulan bu birliktelik sayesinde likenler, normal olarak yaşayamayacakları alanlarda yaşayabilmektedirler (Nash and Thomas 1996).

Likenler kutuplardan ekvatorial bölgelere ve dağ zirvesinden sahil kenarına kadar yayılış gösteren sıra dışı canlılardandır (Nash and Thomas 1996; Aslan vd 1998). Yavaş büyümekte fakat yavaş büyümelerini ürettikleri aromatik yapılı sekonder metabolitler sayesinde avantaja çevirebilmektedirler (Cocchietto *et al.* 2002; Dilsizoğlu vd 2004; Yazıcı ve Aslan 2006).

Likenler çok eskiden beri birçok ülkede tıbbi amaçlarla geleneksel ilaç olarak kullanılmıştır. Likenler kıtlık zamanlarında insanlar tarafından besin olarak da değerlendirilmiştir (Koçer 2012). Yüzyıllardır morfolojik şekillerine bakılarak değerlendirilmiş ve renklerine, morfolojik benzerliğine veya organlara benzerlikleriyle

ilişkilendirilerek tedavi amaçlı kullanılmışlardır. Örneğin: uzun iplikli bir yapıda olan *Usnea florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg. saç uzatmak, saçların dökülmesini engellemek için, loblu bir tallusa sahip olan ve akciğerin iç yapısına benzetilen *Lobaria pulmonaria* (L.) (Hoffm.) akciğer hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Zeybek and John 1992; Dilsizoğlu vd 2004; Boustie and Grube 2005). Benzer şekilde sarı renkli liken olan *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. sarılık hastalığının tedavisi için önerilmiştir. Kafatası likeni olarak adlandırılan *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. veya diğer bazı türlerin epilepsi tedavisi için çok önemli olduğu belirtilmiştir (Brisdelli *et al.* 2013).

Liken ekstratları uzun yıllardan beri halk arasında kullanılmaktadır. Milattan sonra 18. yy' da Mısır'da tıbbi amaçlı kullanılmıştır. Kemotöropatiklerin başarısızlığa uğraması ve antibiyotiğe dirençli patojenik mikroorganizmaların enfeksiyonları, antimikrobiyal aktiviteleri açısından pek çok bitki sekonder metabolitinin araştırılmasına neden olmuştur (Aydın ve Kınalıoğlu 2010).

Likenlerdeki farmasötik araştırmalar, 1950'lerde antimikrobiyal bileşiklerin bulunmasıyla başlamıştır (Aydın ve Kınalıoğlu 2010). Dünyanın birçok yerinde çeşitli ekosistemlerin önemli bir kısmını oluşturan likenler üzerinde yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Nanoteknoloji çağı olarak nitelendirilen 21. yüzyılda, liken sekonder metabolitleri de dikkat çekmektedir. Shahi *et al.* 2003 *Usnea longissima'* nın mikobiyontunu kültür ortamında yetiştirdikten sonra usnik asit nanopartikülleri üretmesini sağlamışlar ve elde edilen nanopartiküllerin insan mantar hastalıklarına karşı antifungal etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Likenler tarafından sentezlenen sekonder metabolitleri mantarlar oluşturmaktadır. Şuana kadar 1000 den daha fazla oranda sekonder metabolitin varlığı tespit edilmiştir (Huneck 1999; Lokajová *et al.* 2014).

İlk olarak likenlerin antimikrobiyal özelliklerinin olup olmadığı yönünde araştırmalar yapılmış ve 1940'lı yıllarda penisilinin ve mantarlardan elde edilen diğer antibiyotiklerin keşfinden sonra araştırmacılar liken sekonder maddelerinin biyolojik aktiviteleri üzerinde bilimsel çalışmalara ağırlık vermişlerdir. Liken maddelerinin bu

özelliği günümüzde alternatif antibiyotiklerin eldesi konusunda hala güncelliğini korumaktadır (Ingolfsdottir *et al.* 2000; Katz 2002; Rankovic *et al.* 2007).

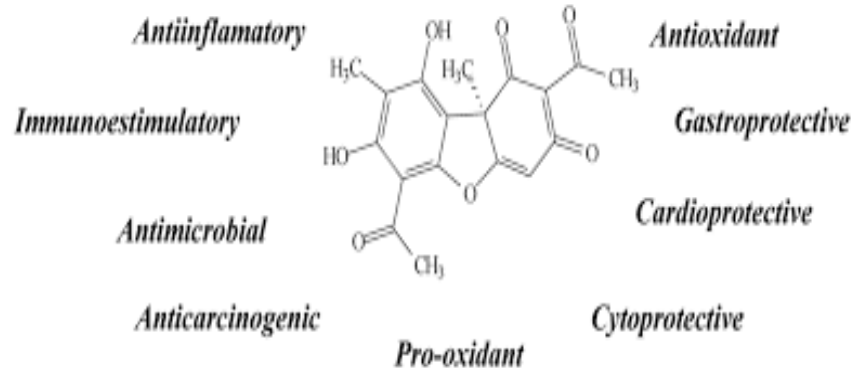
Liken metabolitlerinin farklı mikroorganizmalar, mayalar ve siyanobakteriler üzerine antibiyotik etki gösterdiği uzun yıllardan beridir bilinmektedir (Duman 2007). Yüzyıllardır halk sağlığında kullanılan likenler ürettikleri sekonder metabolitlerine göre değil morfolojik yapılarına bakılarak yararlanılmıştır. Bu sebepten dolayı eskiden kullanılan likenlerin çok özel sekonder metabolitleri kimyasal olarak ya da başka birçok açıdan tam olarak aydınlatılamamıştır (Anar 2013).

Likenlerin sekonder metabolitleri birçok alanda kullanılmaktadır. Bilim adamları artık yeni moleküller ortaya koymaktan ziyade var olan moleküllerin biyolojik önemini araştırmaya başlamışlardır (Boustie and Grube 2005; Ağar vd 2010; Alpsoy vd 2011; Aslan vd 2011; Kotan vd 2011, 2013; Anar 2013; Nardemir vd 2013). Özellikle biyolojik aktivite çalışmalarında bu sekonder maddelerin her geçen gün yeni özellikleri keşfedilmekte ve bilhassa ilaç araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Kendine özgü olarak ürettikleri maddeler ile sıra dışı yaşam özelliklerine sahip oluşları ve bu maddelerin sitotoksik etkilerinin az oluşu nedeniyle likenler günümüzdeki çalışmaların odağı haline gelmiştir (Huneck 1999).

Oran 2006'ın bildirdiğine göre, liken kimyası ile ilgili çalışmalar 1831 yıllarında Bebert tarafından vulpinik asitin izolasyonu ile başlamıştır. Daha sonra Alms 1832 Pikrolikenik asidi, Knopp 1844 ise Usnik asiti izole etmiştir. Vulpinik asit ve Lekanorik asit (Hesse 1900) kimyasal yapıları açıklanan ilk liken metabolitleridir (Elix *et al.* 1996).

Liken metabolitleri arasında en çok, en etkili maddelerin *Usnea longissima* Ach.'dan izole edilen usnik asittir. Usnik asit ilk kez 1844 yılında Alman bilim adamı Knopp tarafından izole edilmiş bir liken sekonder metabolitidir (Giray vd 2009; Sahu *et al.* 2012; Özenoğlu vd 2013). Bu madde Şekil 1.1.de de görüldüğu gibi dibenzofuran türevidir ve kimyasal yapısı 2,6-diasetil-7,9- dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3 ('H,9bH) dibenzofurandion (C₁₈H₁₆O₇)'dur

(Bessadottir 2012; Shi *et al.* 2013). Usnik asit gibi sekonder metabolit kristalleri mikobiyont hiflerinin yüzeyinde oluşur fakat aynı zamanda alg hücrelerinin yüzeyinde de meydana gelebildiğine dair kanıtlarda mevcuttur (Bağkor *et al.* 1998).



Şekil 1.1. Usnik asitin kimyasal yapısı (Huneck 1999).

Usnik asit, *Usnea longissima*, *U. articulate*, *U. complanata*, *U. meridionalis*, *U. Barbata* ve *Cladonia arbuscula* gibi türlerden veya *Usnea*, *Alectoria*, *Cladonia*, *Ramalina*, *Lecanora*, *Parmelia* ve *Evernia* cinslerine ait türlerden de elde edilir. *Alectoria* türleri usnik asitçe oldukça zengindir ve ağırlıklarının yaklaşık % 6'sına kadar usnik asit içerebilirler. Oda sıcaklığında katı, sarı renkli ve acı tatlı kortikal bir pigmenttir. Doğada D ve L formlarında veya rasemik olarak bulunur. Sodyum usniyat tuzu şeklinde ABD ve diğer bazı ülkelerde zayıflama preparatlarının içine eklenmektedir (Ingólfssdóttir 2002; Giray vd 2009).

Bir çok araştırmacı ekolojik faktörlerin likenlerdeki sekonder metabolit konsantrasyonu üzerindeki etkisine odaklanmışlardır. Usnik asitin konsantrasyonunun farklı ekolojik koşullardan güçlü derecede etkilendiğini gözlemlemişlerdir. Ravinskaya 1991, ışık, sıcaklık ve nem miktarının asit oranının farklılığında önemli derecede rol oynadığını göstermiştir. Mevsimsel değişim de usnik asitin konsantrasyonunu değiştirmiştir. Yaklaşık 3 yıl boyunca aylık olarak yapılan oran ölçümlerinde muhtemelen ışık yoğunluğuna bağlı olarak kış ve ilkbahar mevsimlerinde yüksek, yaz ve sonbahar mevsimlerinde düşük olduğu görülmüştür (Cocchietto *et al.* 2002).

Usnik asit birçok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmıştır. Correche *et al.* 2002 Usnik asitin antimikrobial ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu ve dalak lenfosit büyümesini tamamen inhibe ettiğini göstermişlerdir. Kumar and Müler 1999 İn vitro çalışmalarda usnik asitin lökotrien sentezini inhibe ettiğini görmüştür.

Usnik asidin enantiomeri belirtilmemekle birlikte Ames testinde mutajenik olmadığı kanıtlanmıştır (Anar 2013). Usnik asit içeren krem, deodorant, diş macunu, ağız suyu ve güneş koruyucu gibi birçok medikal veya kozmetik ürün kullanılmaktadır. Usnik asit, Asya, Afrika ve Avrupa'da ağrı kesici, ateş düşürücü, yara iyileştirici ve ekspektoran olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Ingólfssdóttir 2002).

Bu maddenin antitüberküloz, antibakteriyel, antiprotazoal, antimikotik, antiviral, antiproliferatif, antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkinliklerini incelemek için yapılan çalışmalar mevcuttur (Yamamoto *et al.* 1995; Giray vd 2009). Ayrıca meme kanseri, genital organ kanseri ve akciğer kanseri inhibitörleri olduğu da rapor edilmiştir (Mayer *et al.* 2005; Burlando *et al.* 2009; O'Neill *et al.* 2010).

Lewis ilk kez 1975 yılında usnik asitin antitümör aktivitesini akciğer kanseri, farede P388 lösemi ve diğer birçok kanser tipine karşı etkili olduğunu bulmuştur (Einarsdóttir *et al.* 2010; Backorova *et al.* 2011; Özenoğlu vd 2013). Daha sonra usnik asidin kanser hücrelerinde apoptozisi başlattığı, ayrıca antimitotik etki gösterdiği belirlenmiştir. Fakat usnik asit toksisitesinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Diğer liken metabolitleri, kanser hücrelerine karşı antiproliferatif, antifungal, anti-HIV, anti kanser gibi etkilere sahip olduğu test edilmesine rağmen elde edilen mevcut veriler oldukça azdır (Backorova *et al.* 2011; Shrestha 2013).

Usnik asit kendi başına son derece etkili bir antibiyotiktir ancak suda çözünmez veya çok az çözünür. Bu sebeple ticari kullanımı sınırlıdır. Ayrıca birçok insanda alerjiye sebep olmaktadır ve bu maddenin kullanımı uzun zamandır sorgulanmaktadır. Bu sınırlılığı aşmak isteyen bilim insanları usnik aside benzildimetil-{2-[-(p-1.1.3.3-tetrametilbütülfenoksi)-etoksi]-etil}-amonyum klorür grubu eklemiştir (Koçer 2012).

Usnik asitin sıçanlarda antiülser ve antioksidan etkilere sahip olduğu bilimsel olarak da ortaya konmuştur (Halici vd 2005; Bayır vd 2006; Odabasoğlu vd 2006).

Usnik asidin, gastroprotektif, kardiovasküler, sitoprotektif, anti-inflamatuvar, antikarsinojenik gibi birkaç biyolojik özelliği gözlenmiştir (Shrestha 2013; Kosanic *et al* 2013). Günümüzde hızla yayılan kanser hastalığından dolayı usnik asidin son yıllarda daha çok antiproliferatif, antitümör, antisitotoksik ve anti kanserojenik etkisi üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

Kanser; insan sağlık sistemi üzerinde önemli sosyal ve ekonomik etkilere sahip ciddi bir problemdir. Teşhis, korunma yöntemleri ve tedavilerdeki gelişimlere rağmen bu hastalık hala bütün dünyada milyonlarca hastayı etkilemekte, onların yaşam kalitesini düşürmekte ve dünyadaki en önemli ölüm nedenlerinden biri olmaktadır. Moleküler biyolojide sağlanan gelişmelerin ışığında kansere karşı ilaç geliştirme çalışmaları tüm dünyada hız kazanmaktadır. Doğal ürünler kanser tedavisinde kullanılmakta ve yan etkisi olmayan alternatif ilaçların araştırılması giderek önem kazanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılacak olan maddelerin tercih edilmesinin en önemli sebebi, sağlıklı hücrelere zarar vermeksizin yalnızca kanserli hücreleri etkilemesidir (Özenoğlu vd 2013).

Kanser tedavisinde temel olarak cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Kullanılan bu yöntemlerin ve ilaçların, tedavide yetersiz olduğu düşünülmektedir. Bu tedavi yöntemleri bazı ciddi 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 olabilmesi için alternatif bir yöntem olarak kullanılması önerilmektedir. Son yıllarda liken sekonder metabolitlerinin farklı kanser hücreleri üzerinde uygulanan çalışmalar umut vericidir (Özenoğlu vd 2013).

Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyada birçok ülkede bitki ekstraktları kullanılarak farklı kanser hücrelerine karşı etkisi ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Tıbbi bitkilerin ekstraktlarının antikanser aktivitelerinin araştırılması konusunda günümüzde birçok çalışma yapılmıştır. Dünya nüfusunun giderek artışı ve yaşlanması gelecekteki kanser yükünü büyük ölçüde etkileyecektir. Bu demografik değişimler göz önünde bulundurulduğunda ve kanser insidansı ile ölüm oranında yıllık %1'lik artış oranına göre hesap yapıldığında 2030'da yıllık 26,4 milyon yeni kanser vakasının ve 17,0 milyon kanser kaynaklı ölümün görülmesi beklenmektedir (Özenoğlu vd 2013).

Yıllardan beridir likenlerin tıbbi amaçla kullanılmaları, hali hazırda aydınlatılmış bazı liken sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivitelere sahip olmalarından dolayı günümüz araştırmacılarının dikkatini çekmektedir. Şimdiye kadarki çalışmalar değişik liken türlerinin mutajenik etkiye sahip olmadığını tam tersine antimutajenik etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Huneck 1999; Açar vd 2010; Güllüce vd 2011; Anar 2013).

Antimutajenik ve antikarsinojenik özelliğe sahip kimyasal bileşikleri araştırmak ve keşfetmek insanlarda giderek artan kanser riskini ve mutasyon oranlarındaki artışı beraberinde getirdiği istenmeyen sonuçlar nedeniyle günümüzde zorunlu hale gelmiştir. Kanseri ve farklı birçok hastalıkların gelişmesine karşı bu metabolitlerin koruyucu olabileceğini gösteren in vivo ve in vitro deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen kanıtlar; kimyasal olarak koruyucu etkiye sahip liken metabolitleri üzerine antimutajenik ve antigenotoksik çalışmaların büyük ölçüde artmasını da sağlamaktadırlar (Anar 2013).

Bazı araştırmacılar, likenlerin antimutajenik etkisinin yapılarında bulunan sekonder metabolitlerin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını tespit etmişlerdir (Gülçin vd 2002; Aslan vd 2006; Açar vd 2010; Alpsoy and Yalvac 2011; Nardemir vd 2013).

sEinarsdóttir *et al.* 2010 usnik asitin iki farklı kanser hücre hattı üzerine anti kanser etkisini gözlemlemiş ve hücreler üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerine karşı sentetik, bitkisel ve fungus kaynaklı ilaçların antikanser etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Özellikle son yıllarda bitki ve fungus kaynaklı elde edilen ekstraktlar ile yapılan çalışmalar sonucunda ümit verici sonuçlar ortaya konmuştur. Yapılan literatür araştırmasında likenlerin antikanserojen etkileri ile ilgili gerçekleştirilmiş çalışmalar, ülkemizde ve dünya literatüründe 2011 yılından itibaren yer almaya başlamıştır. Fakat gerçekleştirilen çalışmalarda sınırlı sayıda liken sekonder metaboliti kullanılmış ve sadece kanser hücresinin bir kaç tipine etkisi gözlemlenmiştir. Liken sekonder metabolitlerinin antikanserojen etkisinin tespiti ile farklı kanser tiplerinde umut verici ilaç aday moleküllerinin bulunması hedeflenmektedir (Kosanic *et al.* 2013; Özenoğlu vd 2013).

Dolayısıyla bu tez kapsamında; en az toksisite ile daha etkin bir tedavi yöntemi geliştirmek amacıyla çalışmamız usnik asitin biyolojik aktivitesi ile ilgili iki farklı yol izlenerek planlanmıştır. İlk aşamada; usnik asitin HUVEC (İnsan göbek kordonu damar endotel) üzerine sitotoksik etkileri araştırılarak güvenilir sınırları belirlenmiş, ikinci aşamada ise kanser hücre hatlarında insan mide kanser (AGS) hücresi, insan servikal kanser (HeLa) hücresi, akciğer kanser (A549) hücresi üzerine bu güvenilir dozların sitotoksik, antiproliferatif, apoptotik etkisi araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hatları

2.1.1. İnsan göbek kordonu damar endotel hücreleri (Human Umbilical Vein Endothelial Cell -HUVECs)

İnsan göbek kordonu damar endotel hücreleri normal olarak insan göbek bağı kordonundan izole edilir. Endotel hücrelerin, patolojisini ve fonksiyonlarını çalışmak için model sistem olarak kullanılmaktadır. İnsan endotel hücre modelinde gerçekleştirilen deneyler sonucunda, genetik faktörlerin incelenmesinin de gittikçe önem kazanmaya başladığı göz önüne alındığında etken maddelerin daha etkili kullanılması mümkün olabilecektir (Park *et al.* 2006).

Endotel hücreler, biyolojik birçok alanda yararlı bir araştırma modeli sağlar. İlk izolasyondan bu yana, insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVECs), uygun bir kültür ortamı ve kolay olduğundan dolayı en çok çalışılan endotel hücrelerdir. Ancak, araştırma için anjiyogenez, geçirgenlik ya da diğerleri gibi süreçler üzerinde odaklanan mikrovasküler endotel hücreler (EC) çalışmak için çok daha önemli fizyolojik modeldir (Song *et al.* 2013).

İnsan göbek kordonu damar endotel hücre hattı (HUVEC) aşısı, antikor ve enzim üretimi, ilaç araştırmaları, hücreler arası bağlantılar gibi birçok farklı deneysel çalışma için bu hücrelerin *in vitro* çalışmasına olanak sağlar. En iyi endotel hücre kaynağı özelliğini taşımaktadırlar. Çalışmalar için kolay bulunur ve maliyeti düşüktür (Yazır ve Dalkılıç 2012).

2.1.2. İnsan servikal kanser (Human Cervix Carcinoma-HeLa) hücre hattı

Araştırmalarda en yaygın kullanılan ve en eski insan hücre hattıdır. Kadın kanserleri arasında ikinci sıradadır (Gökçe vd 2011). 1951 yılında Henrietta Lacks tarafından rahim kanser hücrelerinden türevlenmiştir. Bu hücre hattı son derece dayanıklı ve üretken hücrelerden oluşmaktadır. Diğer hücre hatları gibi laboratuvar ortamında kültürü yapıldığında sınırsız sayıda, kolay ve hızlı bir şekilde çoğalan ölümsüz hücrelerdir. Serviks kanserinin sık görülen nedeni, insan DNA kökenli olan papilloma virüsüdür. Hela hücreleri ilk kez çocuk felci aşısında kullanılmıştır. 1955 yılında başarılı bir şekilde klonlanan ilk insan hücreleridir. Bu hücrelerle, kanser, AIDS, radyasyon ve toksik maddelerin etkisi, gen haritalama, virüs etkenli hastalıklar ve birçok alan üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Landry *et al.* 2013).

2.1.3. İnsan akciğer kanser (Human Lung Carcinoma-A549) hücre hattı

A549 hücreleri adenokarsinomik insan alveolar temel hücreleridir. İlk kez 1972 de D. J. Giard *et.al* tarafından akciğer dokusunda keşfedilmiştir. A549 hücre hattı, akciğer hücrelerinin alveollerine su, elektrot gibi bazı maddelerin difüzyonundan sorumludur. Hücrelerin kültürü yapıldığında tek tabakalı olarak ve yapışarak çoğalmaktadır. İlaç metabolizması için akciğere ait epitel hücreleri için *in vitro* olarak kullanılan model bir hücredir (O'Brien *et al.* 1987).

2.1.4. İnsan mide kanser (Gastrik Adeno Carcinoma-AGS) hücre hattı

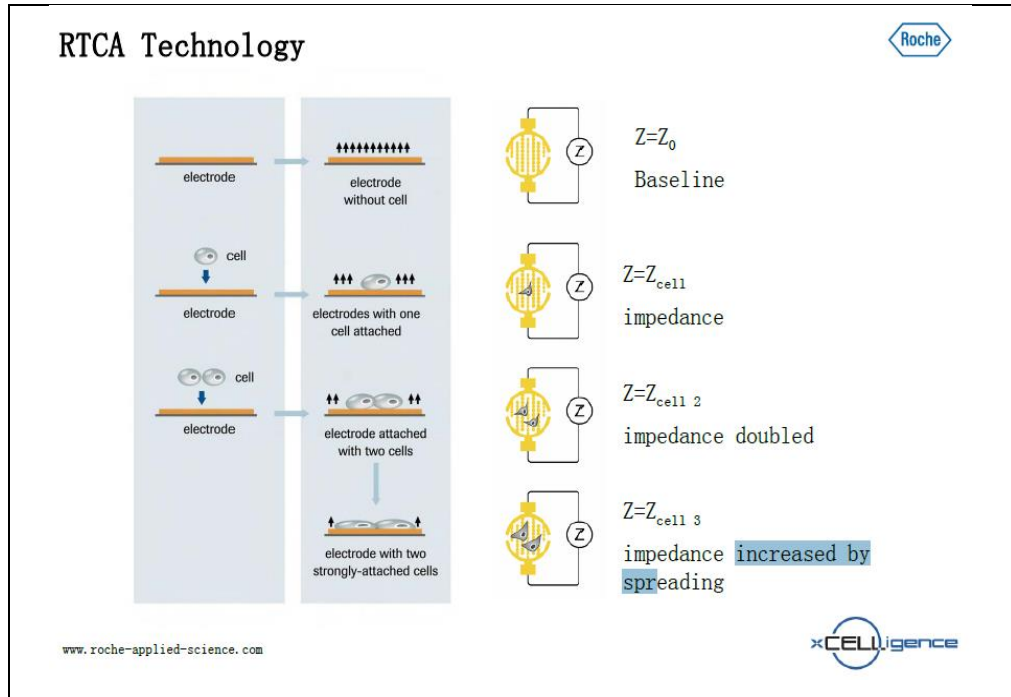
Mide tümörlerinin %90'ı midenin iç yüzünü döşeyen ve salgı bezleride içeren mukozadan gelişir. Bu nedenle bu tümörlere adenokarsinoma denir. Mide kanseri coğrafik özellik gösterir ve en önemli sebebi *Helicobacter pylori* bakterisinin microRNA-223 (miR-223) nın yapısının bozulmasıyla (miR-223'ün aşırı derecede ifade edilmesi ve bunun proliferasyona ek olarak göçü artırttığı) ilişkili olduğu, çalışmalarda belirtilmiştir (Ma *et al.* 2014). *Helicobacter pylori* bakterisinin 1983 yılında ilk kez Robin Warren ve Barry Marshall tarafından ülser neden olduğu

keşfedilmiştir (Johnson *et al.* 2007). AGS *H.pylori* nin farklı etkisini belirlemek için kullanılan bir model hücre hattıdır (Mojtahedi *et al.* 2007).

2.2. RT-CC (Real-Time Cell Counter- Eş zamanlı Hücre Sayımı) Sistemi

RT-CC, hücresel olaylara hiçbir işlem yapmaksızın hücrelerin eş zamanlı olarak analiz edilmesiyle hücre sayısını belirleyen yeni bir teknolojidir. Sistem, hücre kültürü E-platelerinin zeminine yerleştirilmiş mikro elektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçer (Şekil 2.1.).

Empedans ölçümü, hücre sayısı, hücre canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi verir. Bu bilgi, zemini altın nanopartiküllerle döşenmiş plakların, canlı hücrelere elektrik iletimiyle sağlanır (Amaç, hücrelerin mitokondri aktivitesini (canlılık) ve hücrelerin sayısını belirlemektir). Bu sistem mikroelektronik hücresel akım direncine dayanır. Bu cihazla, hücreler üzerine uygulanan toksik bir maddenin; sitotoksik ve genotoksik etkisinin belirlenmesinin yanı sıra hücrelerin sayısı, hücrelerin fiziksel özellikleri, hangi fazda oldukları ve normal şartlarda asla farkedilmeyen bilgiler elde edilir.



Şekil 2.1. RT-CC - xCELLigence sisteminin çalışma prensibi

*Sistemin hücre kültürü E-paletlerinin zeminindeki mikro elektrotlara dayalı olarak elektriksel empedans ölçümü (Anonymous 2013).

2.3. LDH (Laktat Dehidrojenaz) Metodu

LDH, anaerobik glikoliz olayının son ürünü olup, pirüvatın laktata dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. Hücre içine yerleşmiş olan bu enzim vücutta pek çok dokuda (böbrek, kalp, iskelet kası, eritrosit, beyin ve karaciğerde) bulunur. LDH enzimi, 11. ve 12. insan kromozomu üzerindeki lokuslar tarafından regüle edilir. LDH enziminin aktif bölge halkası 100. ve 110. amino asitler arasında yer almaktadır. Yaşa göre oranı değişir. Doğum sonrası bir yaşına kadar en yüksektir. Aynı zamanda kanser hastalarının %95 'nde LDH seviyesi yüksektir. LDH'ın 5 izoenzimi vardır (İnal ve Büyükbaş 2006).

LDH1: Eritrositlerde ve kalp kasında bulunur. Diğer izoenzimlere göre daha duyarlı ve daha spesifiktir.

LDH2: Beyaz kan hücrelerinde bulunur.

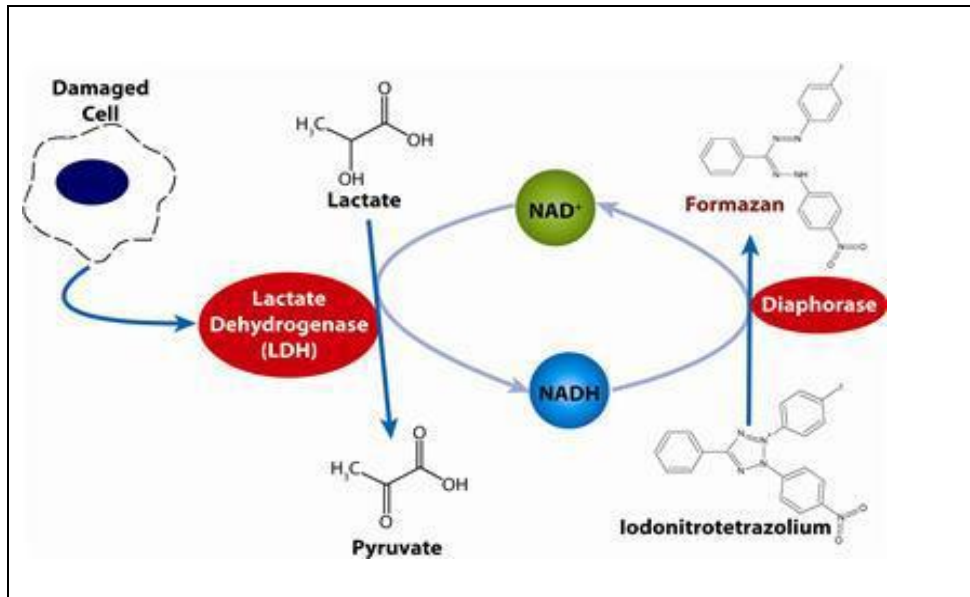
LDH3: Akciğer ve diğer dokularda bulunur.

LDH4: Böbrek, pankreas ve plasenta da bulunur.

LDH5:Karaciğer ve çizgili kaslar da bulunur.

Hücre hasarının olduğu tüm durumlarda LDH düzeyi artar. Dolayısıyla birçok hastalığın teşhisi için önemli bir enzimdir (Karaciğer hastalıkları, miyokard infarktüsü, iskelet kas hasarı, böbrek hastalıkları). Kanser hücrelerinde enerji ihtiyacı çoğunlukla anaerobik yoldan karşılandığından bu yolda etki gösteren LDH4 ve LDH5 düzeyinde normal dokulara göre daha anlamlı ve spesifik sonuçlar oluşur. Laktik asit, oksijenin dokularda azaldığı koşullarda oluşur. Dokuda anaerobik koşul üstünse ortamda çoğalan NADH koenzimi pürivik asidi laktik aside indirger (İnal ve Büyükbaş 2006). LDH deney prensibi şekil 2.2. de gösterilmiştir.

Bu teknik kültür canlılığında gözlenebilen değişimler için kullanılır. Kültür çalışmalarında en yaygın kullanılan enzim LDH'dır. Bu yöntemin ilkesi; ölü hücrelerden açığa çıkan LDH miktarının kolorimetrik olarak saptanmasıdır.



Şekil 2.2. LDH Deney prensibi

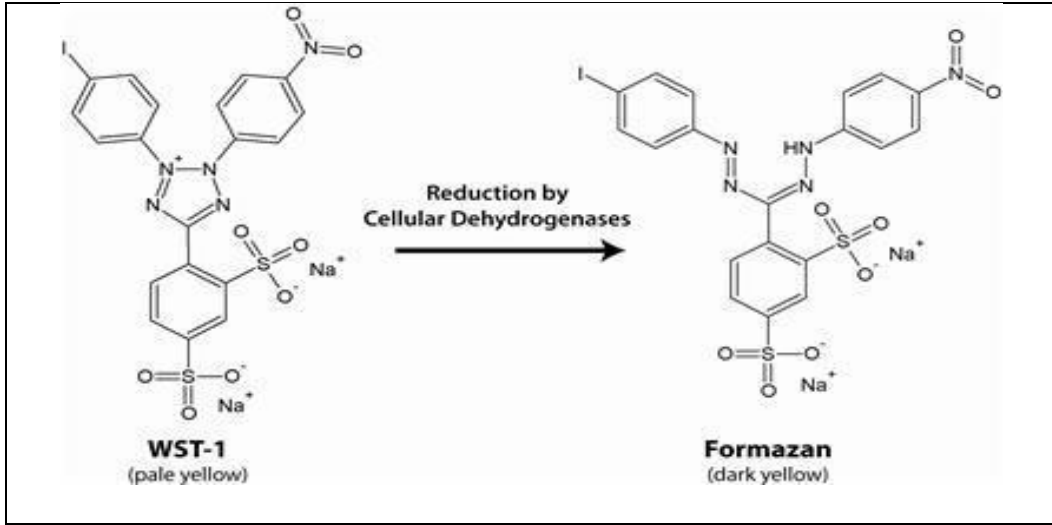
*İlk reaksiyonda, LDH(Laktat dehidrogenaz) laktatı pirüvata oksitleyerek NAD^+ , $\text{NADH} + \text{H}^+$ indirgenir. İkinci reaksiyonda, $\text{NADH} + \text{H}^+$ dan H^+ tetrazolium tuzuna transfer olarak formazona dönüşür (İnal ve Büyükbaş 2006).

Varsayılan intraselüler enzimler, sadece hücre membranı zarar gördükten sonra zarar görmüş hücrelerden hızla salınır. Plazma membranı zarar gören hücreler ve ölümlerin miktarındaki bu artış kültür süpernatantındaki LDH enzim aktivitesinin artışıyla sonuçlanmıştır. Süpernatantaki enzim aktivitesinin miktarındaki bu artış sınırlı zaman periyodu boyunca dönüşen formazonun miktarıyla ilişkilidir. Bundan dolayı deneyde oluşan rengin miktarı lizis olmuş hücrelerin sayısıyla orantılıdır. Formazon boya, sulu bir çözeltilidir ve maksimum bir emilim gerçekleştirilmesine rağmen (yaklaşık 500nm) tetrazolium tuzu bu dalga boyunda önemli bir absorbanans göstermemektedir. Cytotoxicity Detection Kit (Sitotoksositeyi Belirleme Kiti) ile kültür süpernatantındaki LDH aktivitesi, ELISA ile tek bir ölçümle sonuçlar aynı anda kolay ve güvenilir bir şekilde hesaplanabilir (Ülker *et al.* 2012).

2.4. WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) Metodu

Bu yöntem ilk olarak Mossmann tarafından 1983 de ortaya çıkmıştır. Hücre proliferasyon ve hücre canlılığı ölçümü çok önemlidir. Dolayısıyla proliferasyon deneyleri canlı hücrelerin sayısını analiz etmek için uygundur. WST-1, her bir hücrenin proliferasyon miktarını ve hücre topluluğunda hücre canlılığını belirtmek için kullanılır. Bu yöntemle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak belirlenebilir. Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre, canlı hücrelerin metabolik aktivitesidir. Çeşitli kimyasal metaryaller ile su içerisindeki bilgileri tanımlamaya yarayan kitler ile yapılabilen renk değişimi gözlenmesine dayanır. WST-1 suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup, fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur (Terzioğlu vd 2013).

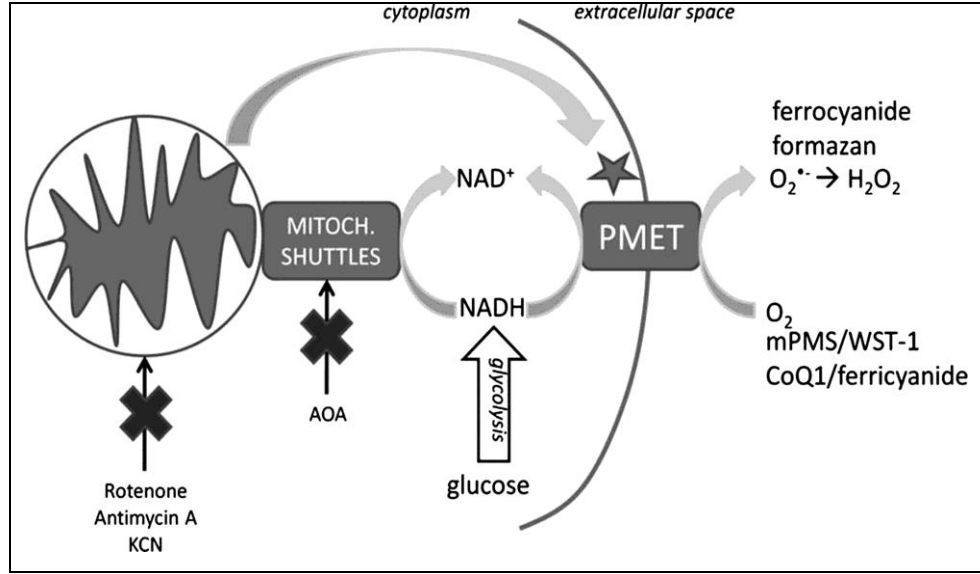
WST-1 yöntemi, sağlam hücrelerde mitokondrinin WST-1 boyasının süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlı olarak tetrazolium halkasını parçalaması işlemine dayanır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli WST-1 boyası koyu mavi-mor formazona dönüşür (Terzioğlu vd 2013). WST-1 yönteminin çalışma prensibi Şekil 2.3'de verilmiştir.



Şekil 2.3. WST-1 Deney prensibi

*Tetrazolium tuzu WST-1 (4-[3-(4- Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1, 3-benzene disulfonate) nın formazona dönüşmesidir (Terzioğlu vd 2013).

Tetrazolium tuzunun, sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazonlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar. Enzim aktivitesinin artması kültür medyumundaki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğrudan ilişkili olarak formazon boyasının üretiminde ve miktarında artışa neden olmaktadır. WST-1 kiti eklenerek bu dönüşüm sırasında üretilen formazonun miktarı ELISA ile okunur. Boya solüsyonunun absorbansı uygun dalga boylarında ölçülür. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Şekil 2.4’de mitokondride meydana gelen hasarın ardından WST-1’in oksitlenerek formazona dönüşmesi gösterilmiştir (Ülker 2011).



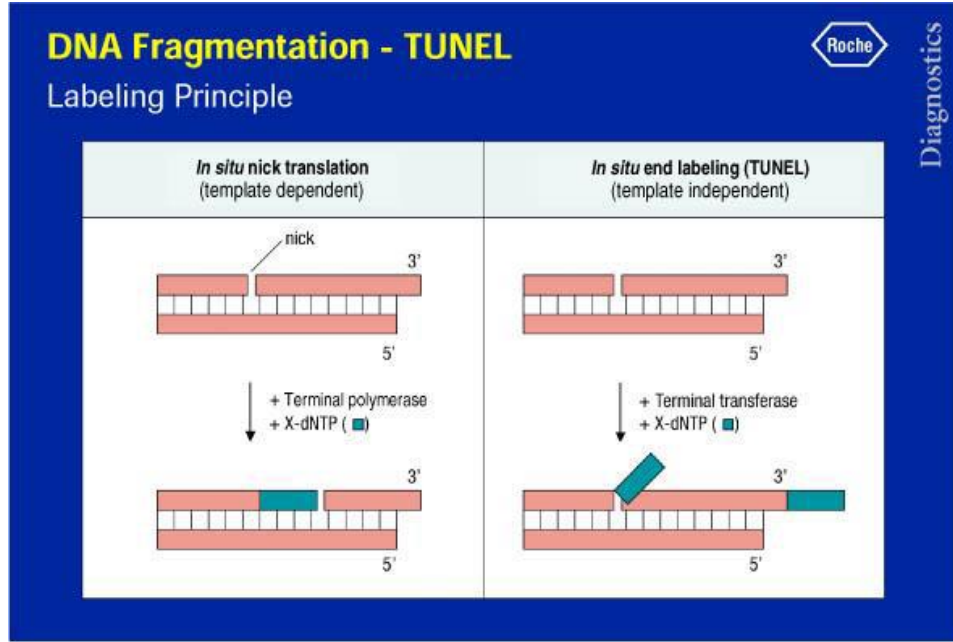
Şekil 2.4. Mitokondride meydana gelen hasarın ardından WST-1'in oksitlenerek formazona dönüşmesi (Ülker 2011).

Çoğalan hücreler prolife olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonuda belirlenir. En iyi sonuç için hücrelerin log fazındaki gelişiminin 10^6 cells/m² aşmaması gerekir (Larche 2000).

2.5. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidly Transferase dUTP Nick End Labelling) Metodu

Bu yöntem Garvrieli Sherman ve Ben Sasson tarafından 1992 yılında tanımlanmıştır. DNA kırıklarını, apoptotik hücrelerde belirlemek için kullanılan bir metottur. Çünkü apoptozisin son aşamalarındaki ayırıcı özellik, DNA'nın terminal ucunda çoklu 3'-OH ile sonuçlanan nükleer kromatin parçalarıdır. TUNEL, Terminal deoksinukleotid transferaz dUTP nick end labelling yöntemi olarak isimlendirilir. 'Nick end' ile kastedilen nükleozomlar arasındaki DNA bağlanma bölgelerinde endonükleaz aktivitesi ile oluşan DNA 3'-OH gruplarıdır. Bu şekildeki DNA bölünmesi apoptoz için karakteristiktir (Gavrieli *et al.* 1992).

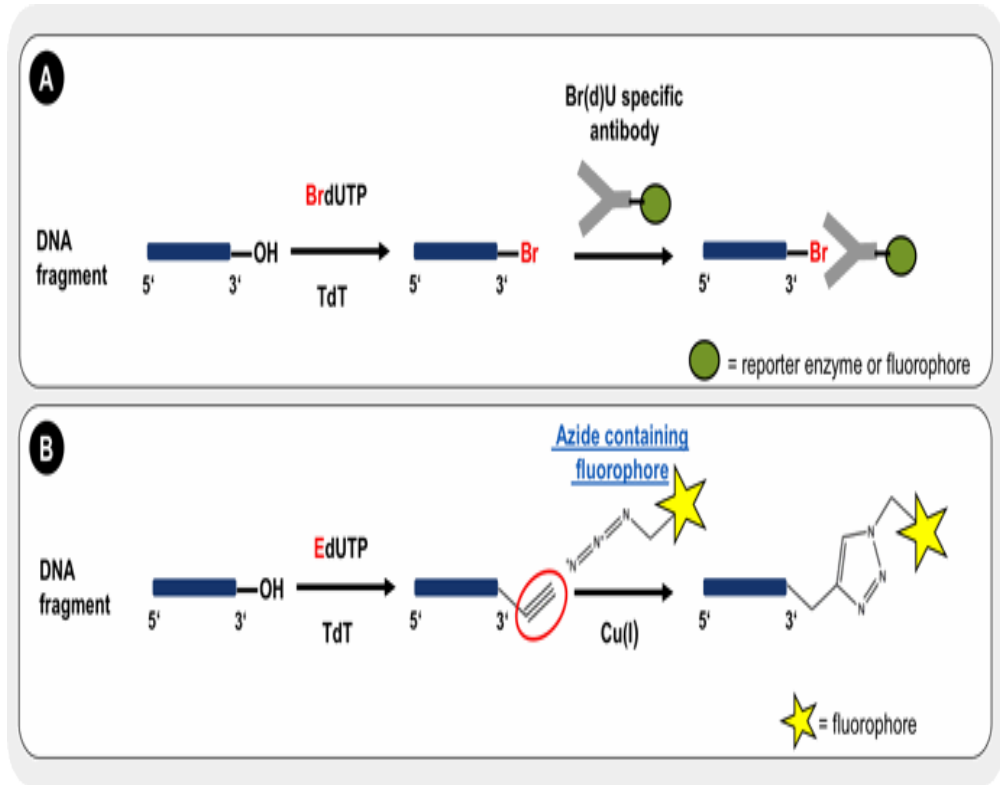
Bu yöntemde; DNA zincir kırıklarının, DNA daki 3'-OH ucuna, deoksiüridin trifosfat nükleotit (X-dUTPs) etiketlerinin eklenmesine aracılık eden, terminal deoksinükleotid transferaz (TdT) enzimi tarafından apoptotik hücreler tanımlanmaktadır (Şekil 2.5). Çok yaygın olarak kullanılan bir methodtur (Grasl-Kraupp *et al.* 1995).



Şekil 2.5. DNA da kırık oluşum mekanizması (Grasl-Kraupp *et al.* 1995).

Deney hassasiyeti modifiye olan dUTP lerin etkili birleşmelerine bağlıdır. Diğer anlamda eklenen etiketlerin boyutuna bağlıdır. Floresan olarak etiketlenen birkaç tane dUTP (F-dUTPs), biyotinlenen (B-dUTP) ve digoksigenlenen dUTP ler genel olarak TdT için uygun maddelerdir. Fakat bromine (Br-dUTP) ve bir alkin grubu(E-dUTP) gibi en küçük etiketlerle etiketlenen dUTP'ler, en etkili birleşimi göstermektedir. Bu sebepten dolayı bu deneyde en yüksek hassasiyet muhtemeldir. Apoptotik olmayan hücrelerde X-dUTP lerin çoğu, DNA uçlarında 3'-OH yokluğundan dolayı birleşme olmaz (Negoescu *et al.* 1996). Örneğin; Br-dUTP ler kırık bölgelere bağlandıktan sonra floresan boya ya da haberci bir enzim ile özel bir antikor bileşenleri tarafından sinyaller oluşturulur.

alkil içeren dUTP lerin birleşimi (E-dUTP), bir azid içeren florofor ile katalizlenen Cu(I) alkin-azid tarafından sinyal oluşması prensibine dayanır (Negoescu *et al.* 1998). Şekil 2.6'da TUNEL metodunda DNA da meydana gelen kırıkların sinyal oluşturma mekanizması verilmiştir.



Şekil 2.6. DNA da meydana gelen kırıkların sinyal oluşturma mekanizması (Gavrieli *et al.* 1992).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Genel olarak kullanılan kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1 de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Genel olarak kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasal materyaller	Markaları
PBS	Biochrome AG
FBS	Biochrome AG
RPMI	Biochrome AG
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche (Germany)
In situ cell death Detection Kit	Roche (Germany)
WST-1 Kit	Roche (Germany)
5-Bromo-2 deoxyuridine(BrdU)	Sigma
DMEM	Gibco ^R
Trypan Blue	Sigma
Tween20	Merck
Triton-X	Merck
Paraformaldehit	Merck
CCl ₄	Merck
DMSO	Merck
Methanol (60%)	Merck
Usnik asit	Santa Cruz Biotechnology(Germany)
HUVEC	Sigma- Aldrich
AGS	Sigma-Aldrich
A549	Sigma-Aldrich
HeLa	Sigma- Aldrich

3.1.2. Genel olarak kullanılan cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve model bilgileri çizelge 3.2. de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Genel olarak kullanılan cihazların listesi ve modeller

Cihazlar	Modelleri
Santrifüj cihazı	Hettich, Mikro 22
Santrifüj Tupü	Mikropipettes Nichiryo
Rotavapor	Rotavapor Buchi
Mikropipet	Mikropipettes Nichiryo
96- well plate	Greiner
CO ₂ inkübatörü	CO ² Incubator Thermo, Sanko
Vortex	IKA Labotechnic
E-Plate	Greiner
Azot Tankı	Termo, Electron Corporation
Faz kontras İnvirt mikroskop	Nikon
xCELLingence (RTCC)	Roche ve ACEA Biosciences
Flask	Greiner
ELISA mikroplate Reader	BioTek-Power Wave, Winooski,
Sıcak su banyosu	Memmert, Germany
Steril Kabin	Esco, Singapore,AC2-4E1
Hassas Terazı	Mettler Toledo, China, AL204
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Su banyosu	Water Bath Nuve
Falkon tüpü	Micropipettes Nichiryo
Pipettor	Reddot Hirschmann Laborgerate

3.2. Metodlar

3.2.1. Usnik asit solüsyonlarının hazırlanması

Liken asidi olan usnik asit % 0,5 lik DMSO da çözülerek hücre kültüründe kullanım için hazır hale getirildi. Çalışmalar için kullanılan dozlar literatür (Russo *et al.* 2012; Singh *et al.* 2013) taramasından sonra 12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM, 200µM olacak şekilde belirlendi.

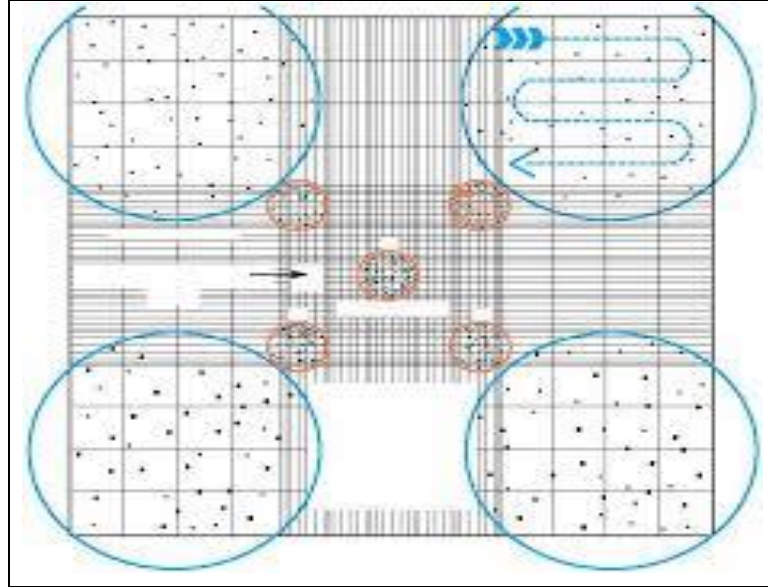
3.2.2. Hücre kültürü

İn vitro ortamda usnik asitin antikanser etkisini gözlemlemek için insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVECs), AGS (insan mide kanser), A549 (İnsan akciğer kanser) ve HeLa (İnsan serviks kanser) hücre hatları seçildi.

3.2.2.a. HUVEC ve kanser hücre hatlarının kültür aşaması

Sıvı azot tankında -196 derecede dondurulmuş olan ve çözüldükleri zaman canlılıklarını koruyan stok hücreler çıkarılırdı ve sıcak su banyosunda 2-3dk çözüldü. Hücreler 3ml'lik DMEM çözeltisi ile karıştırılıp falcon tüpüne aktarıldıktan sonra 5dk 2000 devirde santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Daha sonra 25 ml'lik flasklara %10 luk FBS (9ml DMEM ve 1ml FBS) ve hücre aktarıldı (Eğer hücre sayısı az ise FBS 2ml olarak kullanılabilir). Flaskın kapağı gevşetilerek 37 derecelik %5'lik CO₂ ve karanlık ortama sahip inkübasyonda hücre yoğunluğuna göre 24-48 saat lik sürede pasajlama işlemi yapıldı. Bu aşamada hücreler sürekli mikroskop altında takip edildi. Morfolojik görünüm, besin maddesinin rengi ve hücrelerin yoğunluğu incelendi. Daha sonra 75ml'lik flasklara aktarıldı ve hücre inkübasyonda belli bir süre bekletildikten sonra hücrelerin üzerindeki sıvı besi yeri atıldı. Gereksiz, ölü ve artık hücreleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla flasklara 8ml PBS eklenerek ve dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra flasktan PBS uzaklaştırıldı. Polilizinle kaplı olan flasktan hücrenin kalkmasını sağlamak için 2-3ml'lik tripsin eklenerek 2-3 dk bekletildi.

Flasktaki hücreler invert mikroskop yardımı ile incelendi. Hücre kültür süreci devam ederken hücrelerin boyutu, morfolojik özellikleri ve kontaminasyon olup olmadığı mikroskopta takip edildi. Tripsinin toksik etkisini uzaklaştırmak için flaska 3ml FBS eklenerek pipetaj yapıldıktan sonra flasktaki hücrelerin tamamı bir falkon tüpüne aktarıldı. 5dk 2000 rpm de santrifüj edildikten sonra tüpün üstündeki sıvı kısım atıldı ve tüp 1 ml ye kadar DMEM ile tamamlandı. Hücre DMEM ile homojen hale gelinceye kadar tüpün içinde pipetaj yapıldı. 20 mikrolitre hücre ve 20 mikrolitre tripan mavisi karışımı hemostometreye yüklendikten sonra hücrelerin sayımı Şekil 3.1’de görüldüğü gibi yapıldı (Hücre sayısının en az iki milyon olması gerekir).



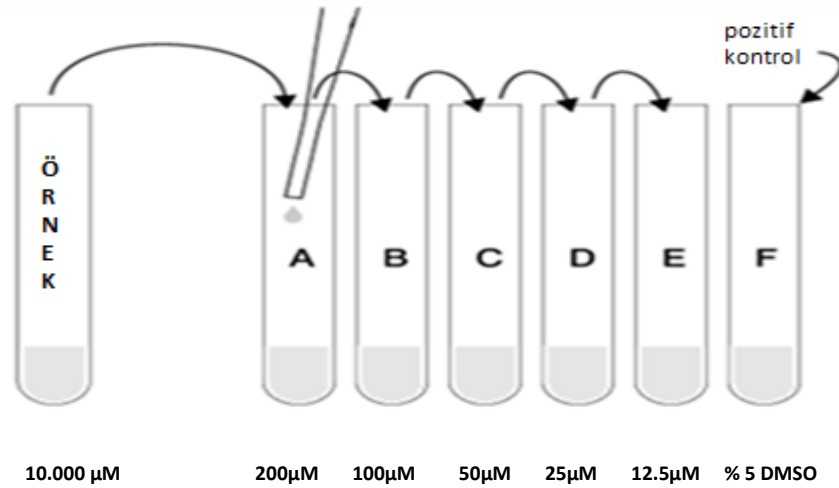
Şekil 3.1. Hemositometreyle hücre sayım aşaması

Bunun yanı sıra, manuel hücre sayımı için: toma lamı, tripan blue boyası, hücre ile boyanın karışması için plak ve inverted mikroskop kullanıldı. Sayım işlemi tamamlandıktan sonra hücreler 96 kuyucuklu platalere pipetle her kuyucuğa 1×10^6 cell/ml oranında hücre aktarıldı. Hücrelerin gelişmesi ve sayı olarak 2×10^6 cell/ml ye ulaşması için 37°C ve %5 CO_2 sahip inkübasyon ortamında 24 saat beklendikten sonra invert mikroskop ile hücrelerin gelişimi gözlemlendi.

3.2.3. Hücrelere usnik asitin eklenmesi

Öncelikle, kullanılacak olan liken asidinin dozları belirlendi. Usnik asit önce 5 ml DMSO da ve üzerine 995ml lik DMEM ile daha sonra sunikatör ve vorteks yardımıyla iyice çözünür hale getirildi. Daha sonra seri dilüsyon yoluyla maddelerin konsantrasyonu ayarlandı. Kültürü yapılmış hücrelerin üzerine kontrol grubu hariç farklı konsantrasyondaki usnik asit üçlü tekrar şeklinde eklendi.

Negatif kontrol grubu olarak %10 luk FBS (9ml DMEM 1ml FBS) den 100 µl kullanıldı. Sitotoksosite ve proliferasyon testleriyle belirlenen oranların hücreler üzerindeki etkisi belirlendi.

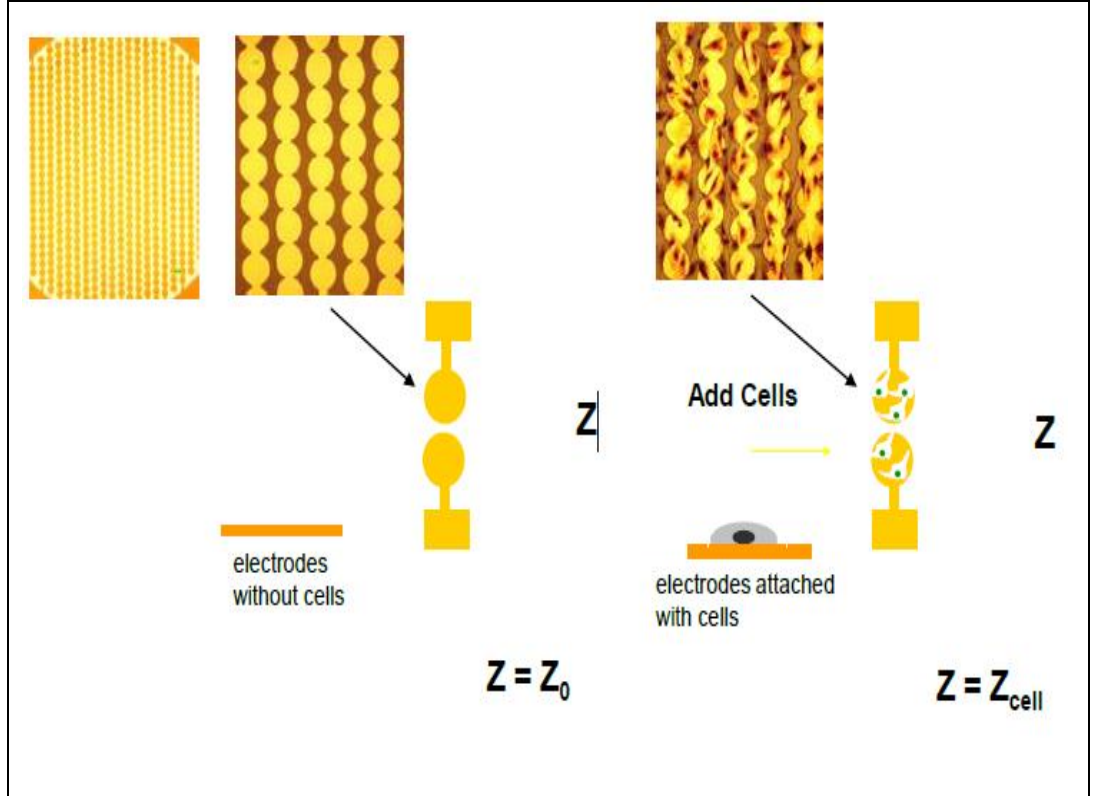


Şekil 3.2. Farklı konsantrasyondaki usnik asidin seyreltilme işlemi

3.2.4. Eş zamanlı hücre sayımı (RT-CC) analizi

Mikroelektronik sensörlerle döşenmiş altın nanopartüküllü 96 kuyucuklu E-plate'in her bir kuyucuğuna ilk adımda 1ml FBS ve 9ml DMEM den oluşan karışımdan 100 µl eklendi ve RTCC cihazına bağlanan E-plate, inkübatörde yaklaşık 2 dk kalibrasyon için bekletilerek cihazdan alındı ve hücre sayımı yapıldıktan sonra herbir kuyucuğa 1,1 ml FBS, 9,9ml DMEM ve 1,1ml HUVEC karışımından 100 µl aktarıldı ve 2. adım için

cihaza tekrar yüklendi. 24 saat cihazda bekletildikten sonra belirlenen dozlardaki maddelerden her bir kuyucuğa negatif kontrol grubu hariç 200 μ l eklendikten sonra cihaz canlı hücelere elektrik iletimiyle maddenin hücreye olan etkisini 999. dakikaya kadar gösterdi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. E-platedeki herbir kuyucuğun hücreyi algılama sistemi (Anonymous 2013).

3.2.5. Sitotoksisite testi (LDH)

Öncelikle kültürü yapılan hücreler gelişim için 24 saat inkübasyonda bekletildi. Ardından bu hücreler plağın tabanına yapıştığı için üst kısımdaki sıvı kısım atıldı. Usnik asitin hücre üzerindeki etkisini incelemek için 96 kuyucuklu plakların herbir kuyucuğuna dozları belirlenmiş usnik asit pozitif kontrol grubu hariç kuyucuklara aktarıldı. Negatif kontrol grubuna ise 100 μ M FBS verildi. 48 saat bekletildi.

Bu aşamanın 24. ve 48. saatinde maddelerin hücreler üzerindeki etkisine bakmak için invert mikroskopta fotoğrafları çekildi.

48 saat sonra inkübasyondan çıkarıldıktan sonra kuyucuklardaki sıvı kısım dikkatli bir şekilde başka bir 96 kuyucuklu plate 100µl oranında aktarıldı. Daha sonra plağın pozitif kontrol kısmına 5µl TRİTON-X eklendi. İnkübasyonda 15 dk bekletildikten sonra ışıktan korunacak şekilde LDH kiti (250µl red cap cytotoxicity ve 11,5µl blue cap cytotoxicity karışımı) 80 µl olarak pozitif kontrol kuyucukları hariç bütün kuyucuklara aktarıldı. Plate alüminyum folyo ile kaplanarak inkübasyonda 1-2 dk daha bekletildi. Daha sonra ELISA da 490/690 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve sitotoksosite hesaplandı. LDH deneyinin uygulama aşaması şekil 3.4. de gösterildi.

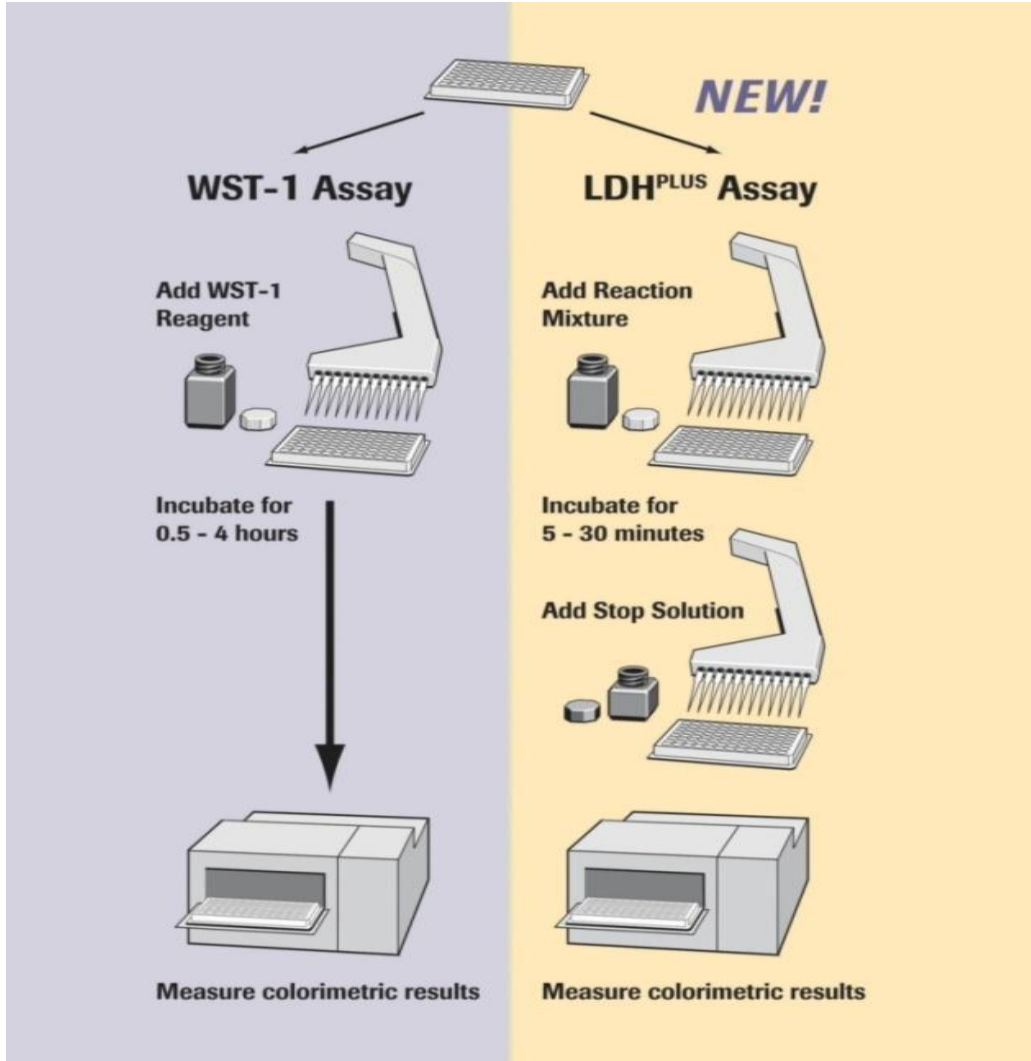
Sitotoksosite(%)

$$=(\text{total hücre değeri} - \text{negatif kontrol}) / (\text{pozitif kontrol} - \text{negatif kontrol}) \times 100.$$

3.2.6. Proliferasyon testi (WST-1)

96 kuyucuklu mikroplate de 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ oranına sahip inkübasyonda 24 saat boyunca bekletilen kültürü yapılmış hücrelerin sıvı kısmı uzaklaştırıldıktan sonra negatif kontrol grubu hariç belirlenen dozlarda usnik asit verildi. Negatif kontrol kuyucuklarına ise 100µl %10'luk FBS (9ml DMEM 1ml FBS) eklendikten sonra maddelerin hücre üzerindeki etkisini görmek için 48 saat inkübasyonda bekletildi. Bu aşamada 24. ve 48. saatte maddenin hücre üzerindeki etkisini görmek için invert mikroskop ile fotoğrafları çekildi.

48 saat sonra inkübasyondan çıkarıldı ve plağın bütün kuyucuklarına negatif kontrolde dâhil 8µl WST-1 kiti eklenerek yaklaşık 4 saat inkübasyonda bekletildi. Bu aşamada sarı renkli WST-1 boyası, tetrazolium halkasının parçalanması sonucu mavi mor formazona dönüştü. İnkübasyondan çıkarıldıktan sonra ELISA'da 490/690 nm dalga boyunda absorbans değerleri hesaplandı.



Şekil 3.4. LDH ve WST-1 deneylerinin uygulama aşaması (Ülker 2011; Terzioğlu vd 2013).

3.2.7. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling)

Yıkama çözeltisi (PBST) nin hazırlanışı; 50 ml PBS (tampon) ve 50 µl DMSO bir tüpte karıştırıldı.

%4'lük paraformaldehitin hazırlanışı; 4 gr paraformaldehitte ve 100 ml PBS karıştırıldı ve PH 7,4 olarak ayarlandı.

%0.1Triton-X+10mM sodyum sitratın hazırlanışı; 100 µl Triton-X (0,1%final), sodyum sitrat MA sına göre mg olarak tartıldı (son konstrasyon 10mM), 98 ml su ile karıştırıldı.

Renk oluşum çözeltisinin hazırlanışı; 50 µl prob (yeşil rnk) ve 450 µl boya solüsyonu karanlık ortamda karıştırılıp vortekslendikten sonra oluşan karışımdan her bir kuyucuk için 20 µl alındı.

DAPI; 9990 µl PBS ve 10 µl DAPI karıştırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl eklendi.

İlk olarak DNA kırıklarını tespit etmek amacıyla 24 kuyucuklu platelerin içine cover slip (kuyucuğun hacmine uygun yuvarlak cam parçası) konuldu. Ekimi yapılan hücre hatları 24 saat inkübasyonda bekletildi. Daha sonra dozları belirlenen, DMSO da çözünen 25 µM lık usnik asit negatif kontrol grubu hariç kuyucuklara aktarıldı.

Pozitif kontrol olarak 5 µM karbon tetra klorat (CCl₄) kullanıldıktan sonra 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan alınarak kuyucukların içindeki sıvılar atıldı. Yıkama işleminin ardından hücrelerdeki artıkların uzaklaşması için 50 µl PBS ve 50 µl tween20 karışımı (yıkama çözeltisi PBST) verildikten sonra 5dk çalkalayıcı da bekletildi.

Kuyucuklar tekrar boşaltıldı ve üzerine %4 paraformaldehitten 150 µl eklenerek bir saat çalkalayıcıda da bekletildi. Kuyucuklar bir kez daha boşaltıldıktan sonra paraformaldehitin etkisini ortadan kaldırmak için 150 µl PBST konuldu ve tekrar yıkandı. 5dk çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra kuyucuklar boşaltıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl Triton-X eklenerek plate 2-3dk buzun üzerinde bekletildi. Kuyucuklar tekrar boşaltıldı ve Triton-X'in ortamdan uzaklaşması için kuyucuklara 100 µl PBST eklendi.

5 dk çalkalandıktan sonra kuyucuklar boşaltıldı. Karanlıkta her bir kuyucuğa 20 µl renk oluşum çözeltisi (50 µl prob(yeşil rnk) ve 450 µl boya solüsyonu) verildi.

Bir saat boyunca 37 derecede inkübasyonda bekletildi. Daha sonra kuyucukların boşaltılması kuyucuklara 150 µl PBST eklenmesi ve çalkalayıcıda 5 dk bekletilmesi işlemi iki kez tekrarlandı. En son kuyucuklar boşaltıldı ve hücrelerde oluşan DNA kırıklarını belirlemek için In Situ Cell Death Detection Kit eklendikten 1 saat sonra, karanlıkta 100 µl DAPI (4',6- diamidino-2-fenylindole) ilave edildi (Proben flouresan aktivitesini kaybetmemesi için bu işlemler karanlıkta yapıldı). Sonuçlar invert mikroskop ile analiz edildi.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

LDH ve WST-1 nin istatistiksel değerlendirilmesi Duncan testi kullanılarak hesaplandı. Tünel testinin analizi için One-way Anova kullanıldı. RTCC (real time cell counter) in istatistiksel değerlendirilmesi, RT-CC(xCELLigence) cihazındaki grafikler ile belirlendi. Zaman, doz ve madde arasındaki istatistiksel farklılıklar ($\bar{X} \pm SE$) analiz edildi.

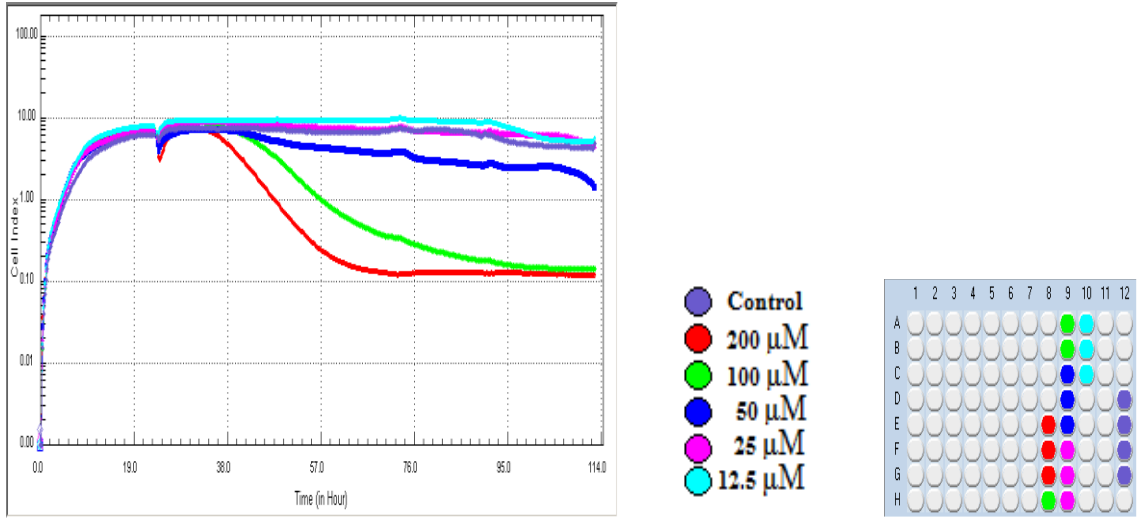
Usnik asitinin dört farklı hücre hattı (HeLa, AGS, A549 ve HUVEC) üzerine olan etkisini belirlemek için SPSS 18,0 analiz programında varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Usnik asit dozları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %5 önem seviyesinde belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

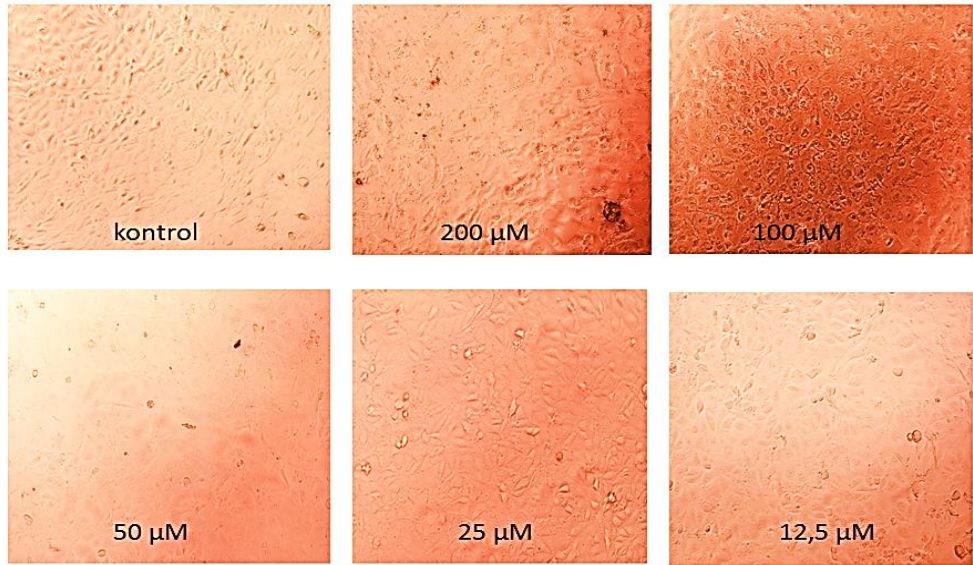
Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar sitotoksikite testi olan LDH, proliferasyon yani canlılık testi olan WST-1, Tunel ve RT-CC sistemi ile farklı hücre hatları üzerinde kullanılacak olan usnik asitin optimum dozlarının belirlenmesi olarak dört başlık altında verilmiştir. Her bir parametre içinde kontrol ve deney grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

4.1. LDH ve WST-1 Testleri İçin Optimum Hücre Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

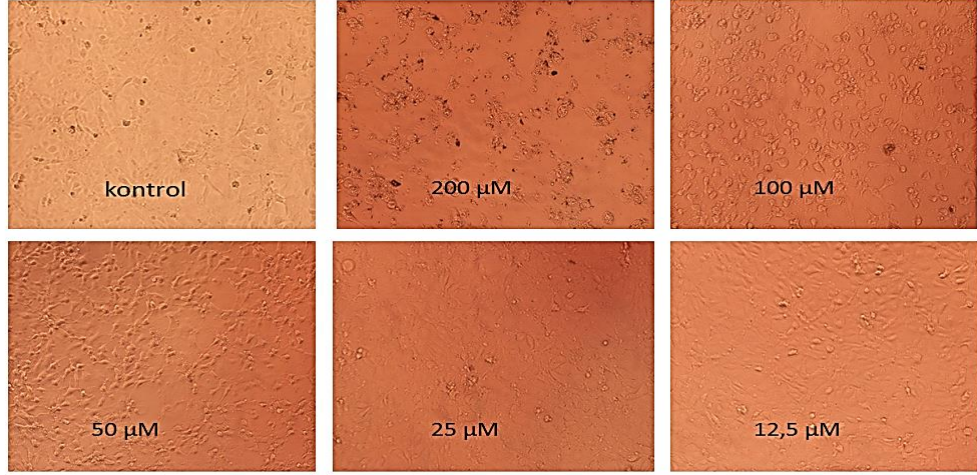
HUVEC hücrelerinde RT-CC (xCELLingence) sistemi kullanılarak usnik asidin optimum konsantrasyonu ve uygulama süresi belirlendi. Grafiğe göre; mor kuyucuklar, herhangi bir maddenin eklenmediği kontrol grubu hücrelerini oluşturmaktadır. Kırmızı ve yeşil kuyucuklar, en fazla sitotoksik ve antiproliferatif etkiye sahip olan 200 µM ve 100 µM'lık, lacivert, pembe ve parlak açık mavi renkli olan son kuyucuklar ise 50, 25, 12,5 µM konsantrasyona sahip olup hücre proliferasyonunu en az etkileyen dozları ifade etmektedir. RT-CC analizi sonucunda HUVEC hücrelerinin optimum uygulama süresi 48. saat ve hücre sayısı 2×10^6 cell/ml şeklinde belirlenmiştir. Ayrıca şekil 4.2 ve şekil 4.3 mikroskopik görüntüde görüldüğü gibi usnik asitin zamana bağlı olarak HUVEC üzerine en az sitotoksik etkisi 50, 25, 12,5 µM dozlardır.



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki usnik asitin HUVEC üzerine etkisi



Şekil 4.2. Usnik asitin 24. Saatte HUVEC üzerine etkisinin mikroskop görüntüsü (x10)



Şekil 4.3. Usnik asitin 48. Saatte HUVEC üzerine etkisinin mikroskop görüntüsü (x10)

4.2. Sitotoksosite (LDH) ve Proliferasyon (WST-1) Testi Sonuçları

Usnik asitin HUVEC ve üç farklı kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi Laktat dehidrojenaz sitotoksite testi ve proliferasyon düzeyi ise WST-1 hücre proliferasyon testi kullanılarak 490/690 nm de absorbands değerlerinin ölçülmesi suretiyle gözlemlendi. Böylelikle birbirinden bağımsız olarak yapılan ve tek grafik haline getirilen iki farklı deneyde sitotoksosite ve proliferasyon değerleri belirlenmiş oldu. Dozları belirlenen maddelerin, HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi RT-CC sisteminde yaklaşık olarak 48. saatte değişmeye başladığı için LDH ve WST-1 testleri 48. saat dikkate alınarak uygulandı.

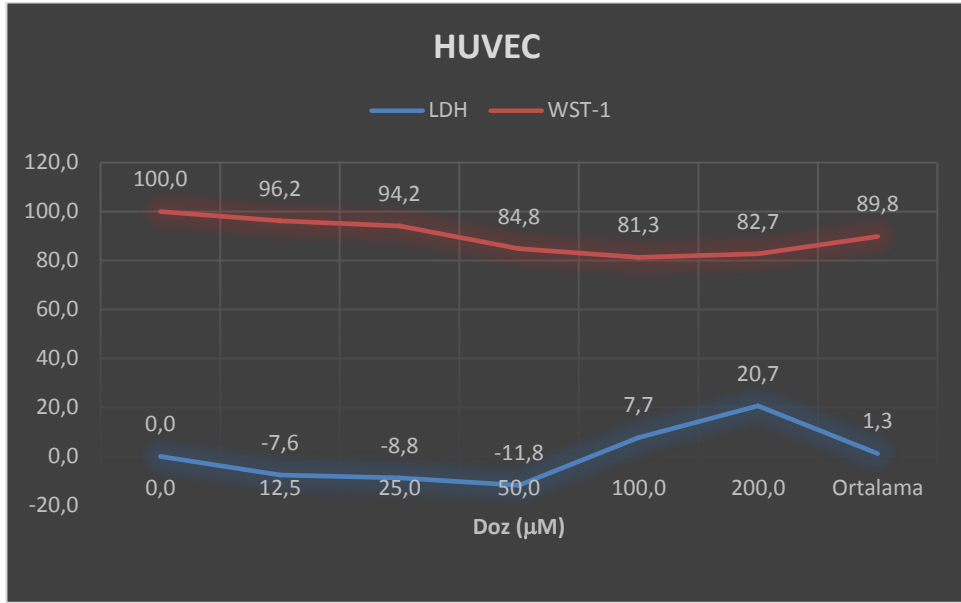
LDH ve WST-1 testleri öncelikle HUVEC üzerine uygulanmış ve bu hücre kültürünün üzerine usnik asitin sitotoksik ve antiproliferatif özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile A549 ve HeLa kanser hücre hatları karşılaştırılarak usnik asidin antikanser etkisi ortaya konulmuştur. Araştırma sonucunda, dört hücre hattında da usnik asitin dozlarının hem sitotoksite ve hemde proliferasyon üzerine olan etkilerinin çok önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. HUVEC ve üç farklı kanser hücre hattında usnik asitin Sitotoksisite (LDH) ve Proliferasyon (WST-1) üzerine olan etkilerine ait varyans analiz sonuçları

Hücre Hatları	Varyasyon Kaynakları	LDH				WST-1			
		SD	KO	F	p	SD	KO	F	p
HUVEC	Usnik Asit Dozu	5	412,020	62,018	0,000**	5	124,572	13,923	0,000**
	Hata	10	6,644			6	8,947		
	Toplam	16				12			
A549	Usnik Asit Dozu	5	173,232	279,356	0,000**	5	235,182	17,053	0,000**
	Hata	9	,620			12	13,791		
	Toplam	15				18			
AGS	Usnik Asit Dozu	5	109,144	69,594	0,000**	5	2091,345	18,624	0,001**
	Hata	6	1,568			6	112,293		
	Toplam	12				12			
HeLa	Usnik Asit Dozu	5	1525,745	52,915	0,000**	5	296,367	31,858	0,000**
	Hata	6	28,834			6	9,303		
	Toplam	12				12			

** : Çok önemli (p<0,01).

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4’de görüldüğü üzere LDH testi sonuçlarımıza göre usnik asitin 12,5 µM, 25 µM ve 50 µM ’lik konsantrasyonlarında HUVEC üzerine herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı, ancak 100 µM ile 200 µM’lik konsantrasyonlarda önemli ölçüde sitotoksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, WST-1 testi sonuçlarımıza göre usnik asitin bütün konsantrasyonlarının HUVEC üzerine antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4). Bu durum, sağlıklı olan HUVEC’lerin sitotoksisite bakımından kanser hücreleri ile kontrol hücre olarak kıyas edilebileceğini ve usnik asitin 100 ve 200 µM’lik konsantrasyonlarının diğer üç kanser hücre hattında antikanser etkisinin belirlenmesi durumunda dahi bu olumsuz etkileri nedeniyle antikanser dozu olarak değerlendirilemeyeceğine karar verilmiştir.



Şekil 4.4. Usnik asitin 5 farklı konsantrasyonunun HUVEC üzerine sitotoksik ve proliferatif etkisi

Çizelge 4.2. Usnik asidin farklı konsantrasyonlarının sitotoksisite üzerindeki etkisi¹

		Kullanılan Hücre Hatları (LDH)			
USNİK ASİT		AGS	HeLa	A549	HUVEC
SİTOTOKSİSİTE TESTİ	Pozitif Kontrol	0 ^c	0 ^c	0,0 ^d	0 ^{c*}
	12,5µM	-3,6 ^d	26,5 ^b	14,6 ^c	-7,6 ^d
	25 µM	-5,5 ^d	29,4 ^b	14,8 ^c	-8,8 ^d
	50 µM	5,3 ^b	38,7 ^b	16,2 ^c	-11,8 ^d
	100 µM	10,1 ^a	71,9 ^a	18,0 ^b	7,7 ^b
	200 µM	12,7 ^a	70,0 ^a	24,8 ^a	20,7 ^a
	Standart Sapma (S _x)	7,1	26,6	7,9	11,9
	F Değeri (Usnik asit)	69,594 ^{**}	52,915 ^{**}	279,356 ^{**}	62,018 ^{**}

** işaretli değerler 0,01 düzeyinde önemlidir.

¹: Aynı sütunda aynı harf ile işaretli ortalamalar 0.05 düzeyinde birbirinden farklıdır.

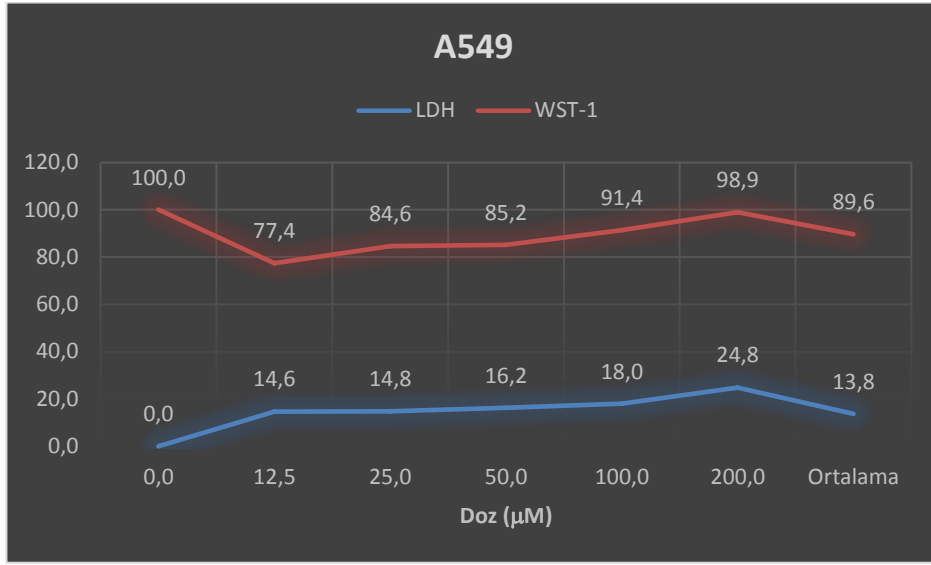
Çizelge 4.3. Usnik asidin farklı konsantrasyonlarının proliferasyon üzerindeki etkisi¹

		Kullanılan Hücre Hatları (WST-1)			
Canlılık Testi	USNİK ASİT	AGS	HeLa	A549	HUVEC
	Negatif Kontrol	100,0 ^d	100,0 ^c	100,0 ^a	100 ^a
	12,5µM	120,0 ^{bc}	93,9 ^c	77,4 ^c	96,2 ^a
	25 µM	119,4 ^{bc}	97,6 ^c	84,7 ^b	94,2 ^a
	50 µM	129,4 ^b	111,6 ^b	85,2 ^b	84,8 ^b
	100 µM	146,3 ^b	123,7 ^a	91,4 ^b	81,3 ^b
	200 µM	193,1 ^a	118,7 ^{ab}	98,9 ^a	82,7 ^b
	Standart Sapma (S _x)	31,8	11,8	8,9	7,8
	F Değeri (Usnik asit)	18,624 ^{**}	31,858 ^{**}	17,053 ^{**}	13,923 ^{**}

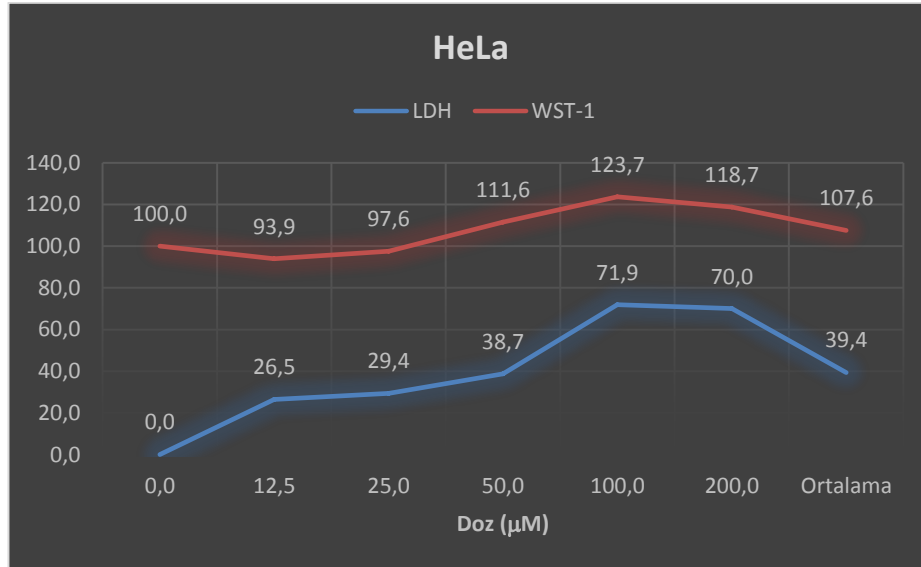
** işaretli değerler 0,01 düzeyinde önemlidir.

¹: Aynı sütunda aynı harf ile işaretli ortalamalar 0.05 düzeyinde birbirinden farklıdır.

Usnik asidin dozlarının A549 kanser hücre hattı üzerine sitotoksik ve antiproliferatif etkileri incelendiğinde doz artışına bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı (Çizelge 4.2), 12,5 µM, 25 µM, 50 µM'lık konsantrasyonlarda, usnik asidin hücre sayısı ve canlılığında düşüş meydana getirdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.5). Daha önce usnik asidin HUVEC üzerine olan etkisinden elde edilen sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde bu dozlar içerisinde 12,5 µM'lık usnik asit konsantrasyonu A549 kanser hücre hattı için en etkili antikanser dozu olarak belirlenmiştir.



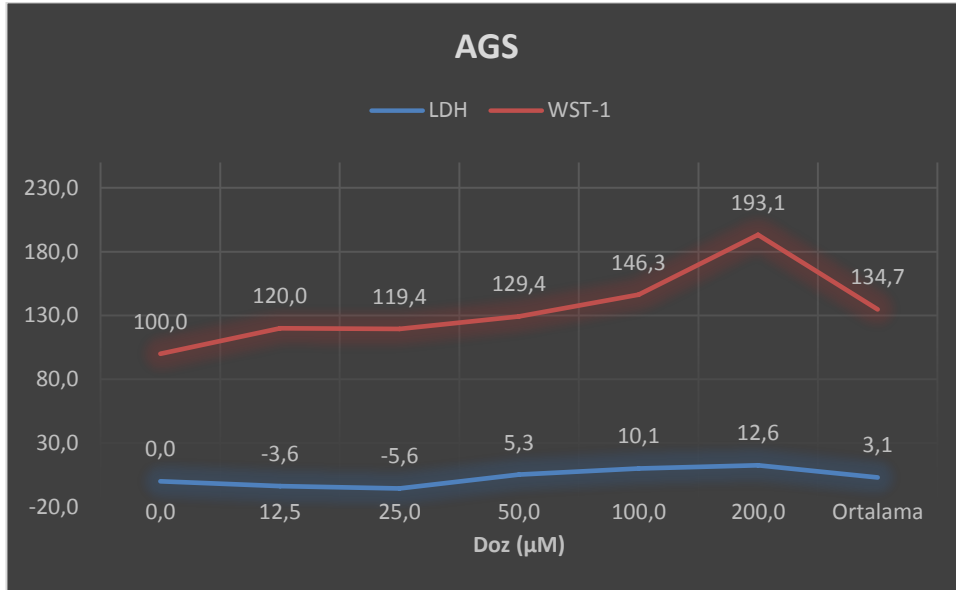
Şekil 4.5. 5 farklı konsantrasyondaki usnik asitin A549 kanser hücre hattı üzerine olan antikanser etkisi



Şekil 4.6. 5 farklı konsantrasyondaki usnik asitin, HeLa kanser hücre hattı üzerine olan antikanser etkisi.

HeLa hücrelerinde ise usnik asitin 12,5 µM, 25 µM lık konsantrasyonlarında antikanser etki gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6). Fakat bu konsantrasyonlardan daha yüksek konsantrasyonların kanserli hücre sayısında artış meydana getirdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6). Diğer taraftan usnik asitteki

konsantrasyon artışına bağlı olarak LDH seviyesinin de arttığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6). Ancak, HUVEC ‘den elde edilen sonuçlarla, HeLa hücrelerine ait LDH sonuçları birlikte değerlendirildiğinde HeLa kanser hattı hücreleri için en iyi konsantrasyonun 12,5 μM olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7. 5 farklı konsantrasyondaki usnik asitin, AGS kanser hücre hattı üzerine olan antikanser etkisi

Usnik asitin farklı konsantrasyonlarının AGS kanser hücre hattına olan etkileri incelendiğinde doz artışına bağlı olarak proliferasyonu arttırdığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.7). Diğer taraftan, usnik asitin 50 μM , 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarında ise hücre sitotoksitesinde kısmi bir artış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.7). Ancak, usnik asitin hiçbir konsantrasyonunun AGS kanser hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olmaması, usnik asitin anti kanser etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

4.3. DNA Fragmentasyon (TUNEL; Terminal Deoxynücleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling) Testi Sonuçları

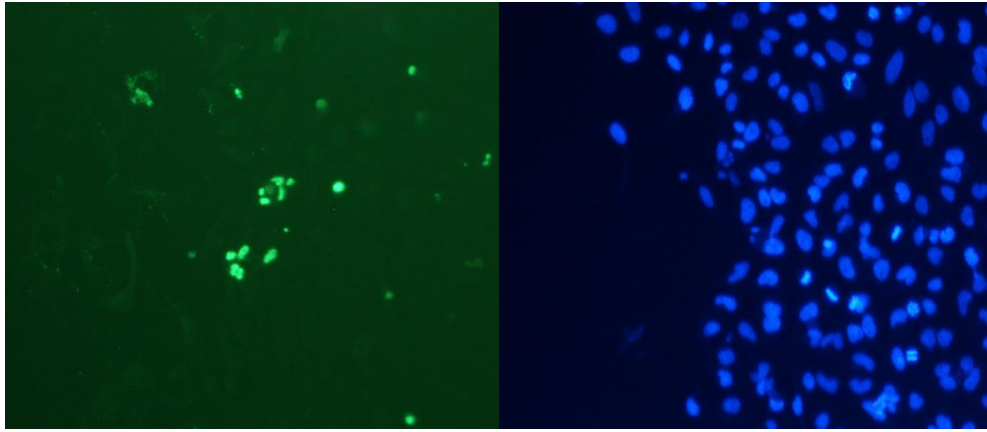
DNA fragmentasyonu, gecikmiş apoptozun bir göstergesidir. 25 μM lık liken sekonder

metaboliti usnik asitin A549, AGS ve HeLa kanser hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi TUNEL testi kullanılarak belirlenmiştir. Bu testle A549 ve HeLa kanser hücre hattında apoptotik hücre sayısı pozitif kontrolle kıyaslanarak invert mikroskop ile sayılarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$ ya da 0.05). Ancak usnik asitin AGS kanser hücre hattında önemli derecede antikanser etki göstermediği rapor edilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16).

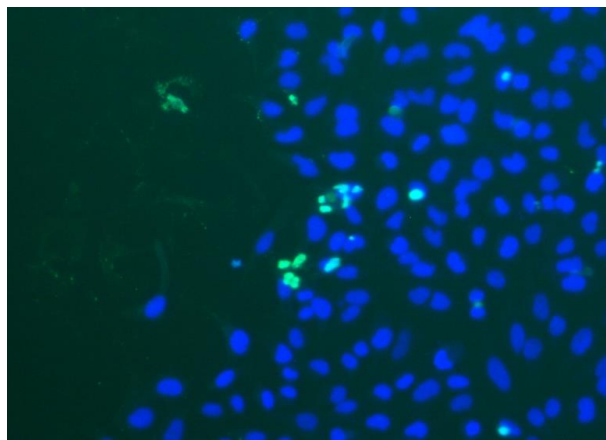
A549 NEGATİF KONTROL

FITC

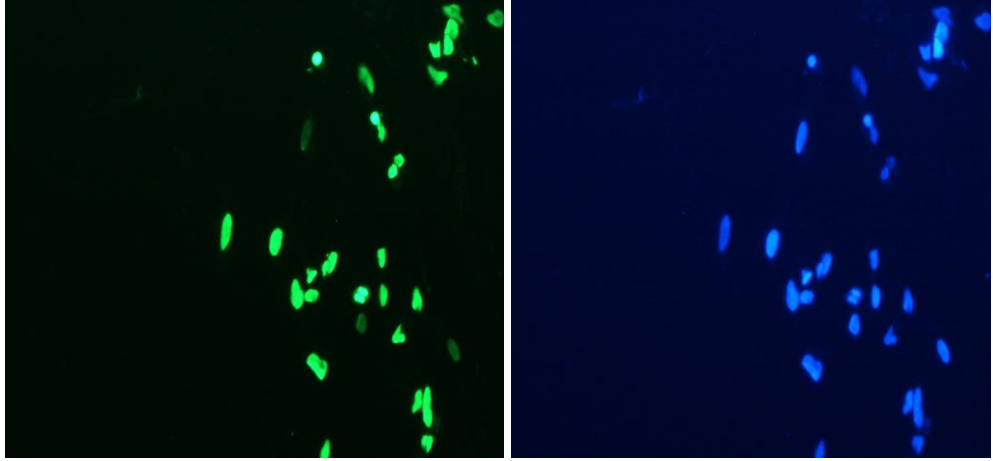
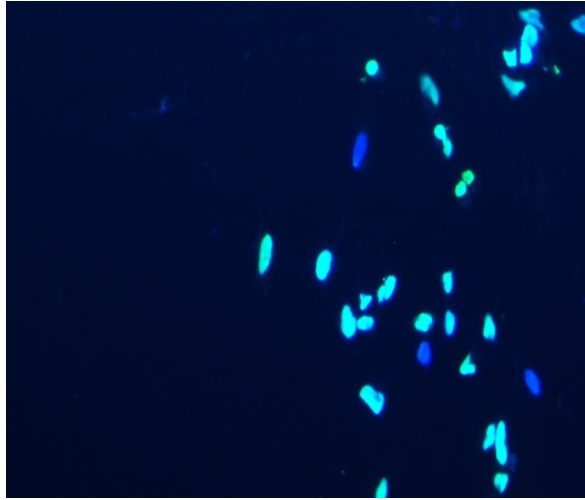
DAPI



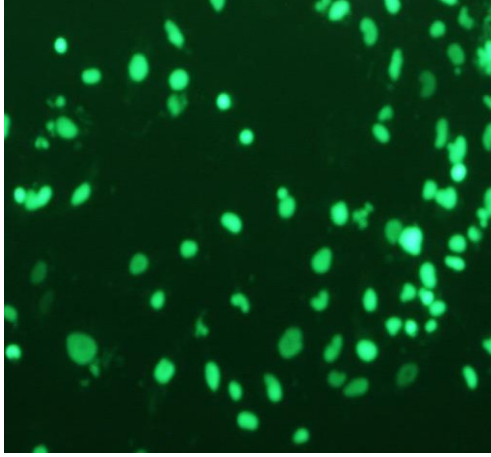
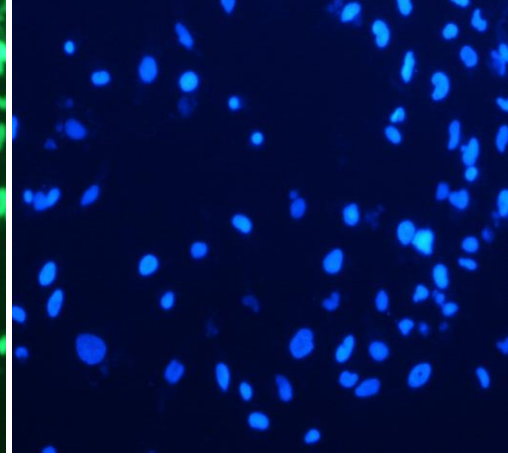
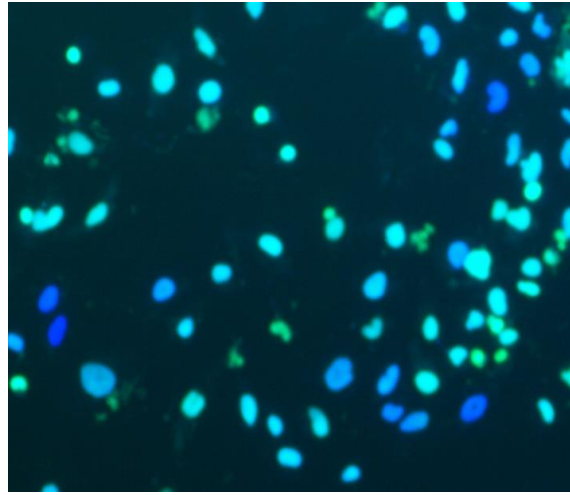
MERGED



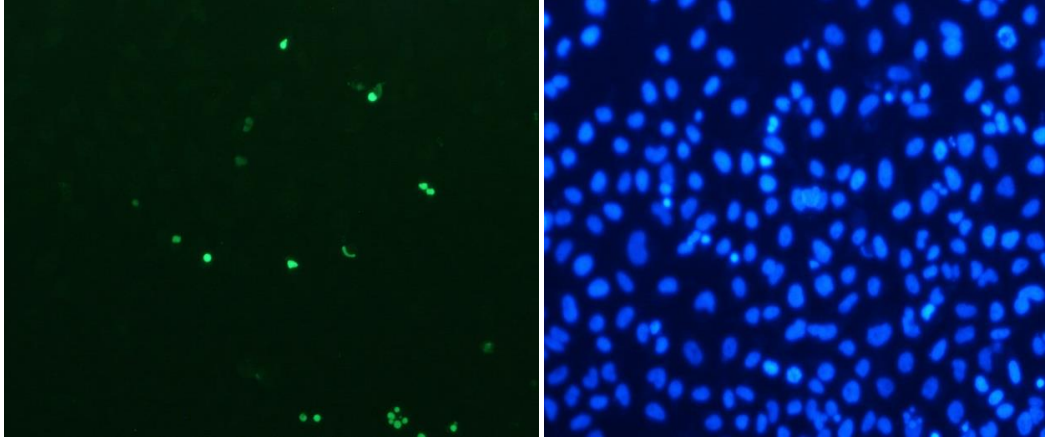
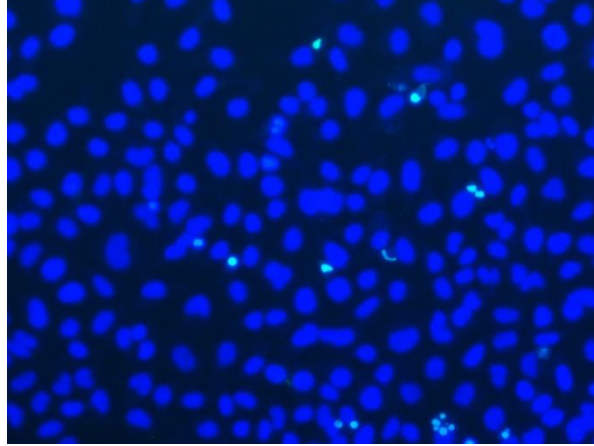
Şekil 4.8. A549 kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki negatif kontrol görüntüsü (x40).

A549 POZİTİF KONTROL**FITC****DAPI****MERGED**

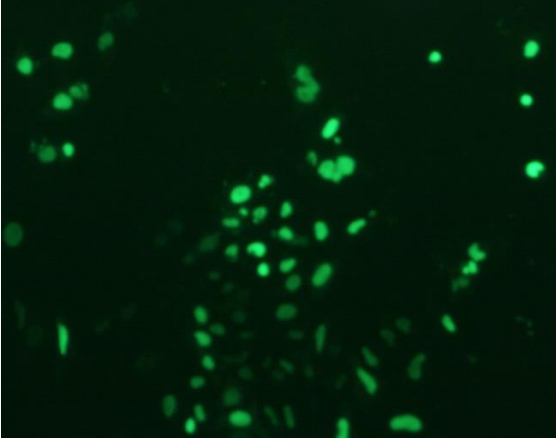
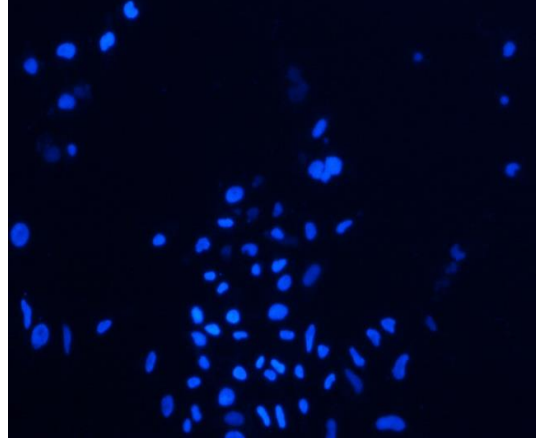
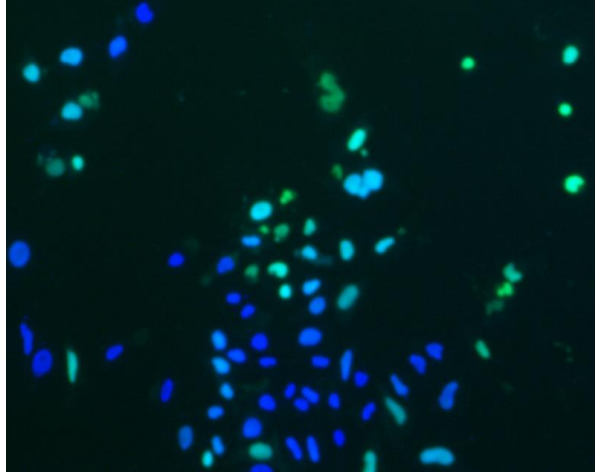
Şekil 4.9. A549 kanser hücrelerinin invert mikroskoftaki pozitif kontrol (CCI4) görüntüsü (x40).

A549 USNİK ASİT**FITCH****DAPI****MERGED**

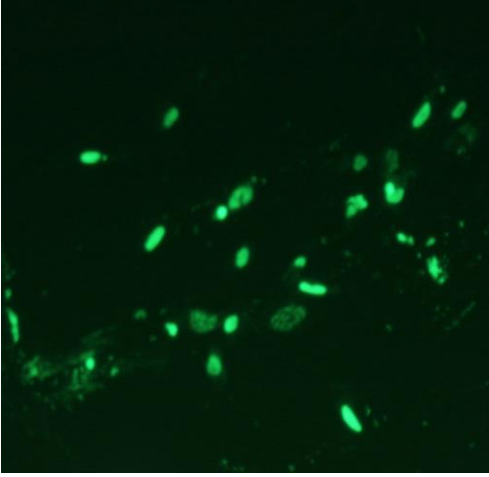
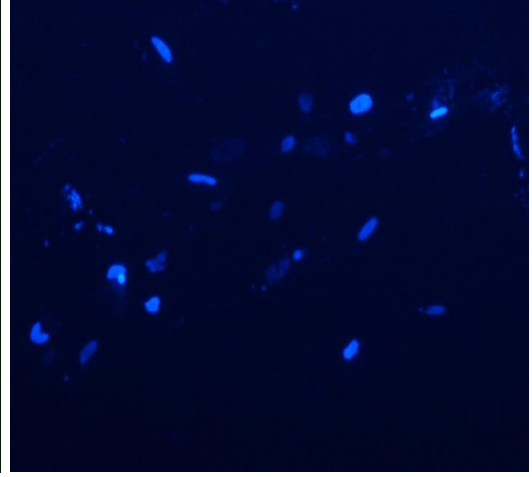
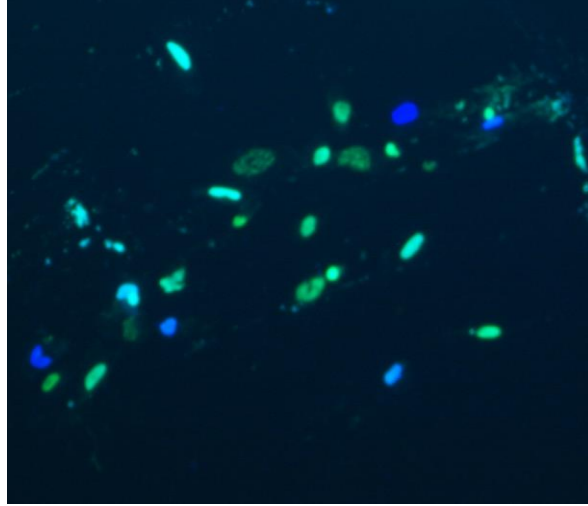
Şekil 4.10. A549 kanser hücrelerinin usnik asit ile muamelesi sonucu invert mikroskoptaki görüntüsü (x40).

AGS NEGATİF KONTROL**FITCH****DAPI****MERGED**

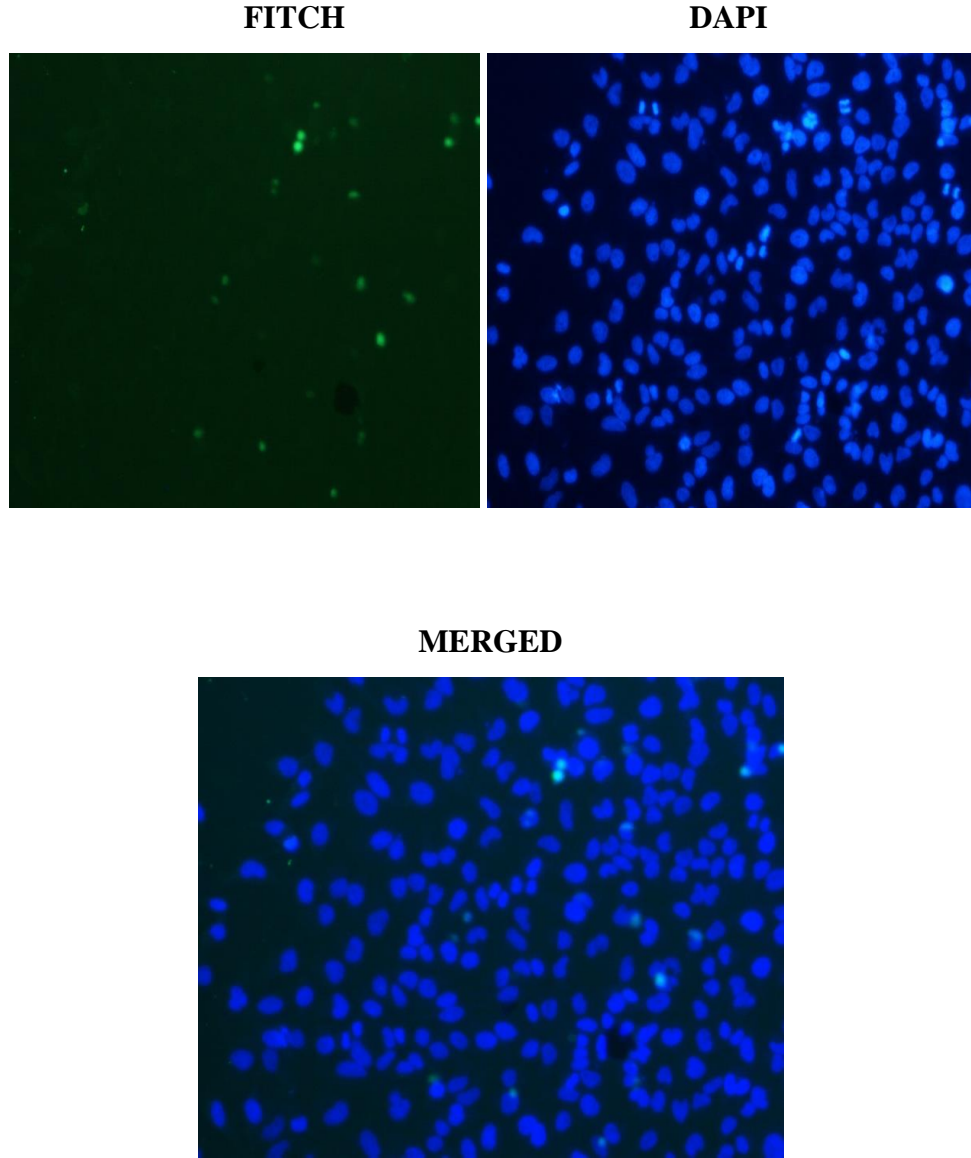
Şekil 4.11. AGS kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki negatif kontrol görüntüsü (x40).

AGS POZİTİF KOTROL**FITCH****DAPI****MERGED**

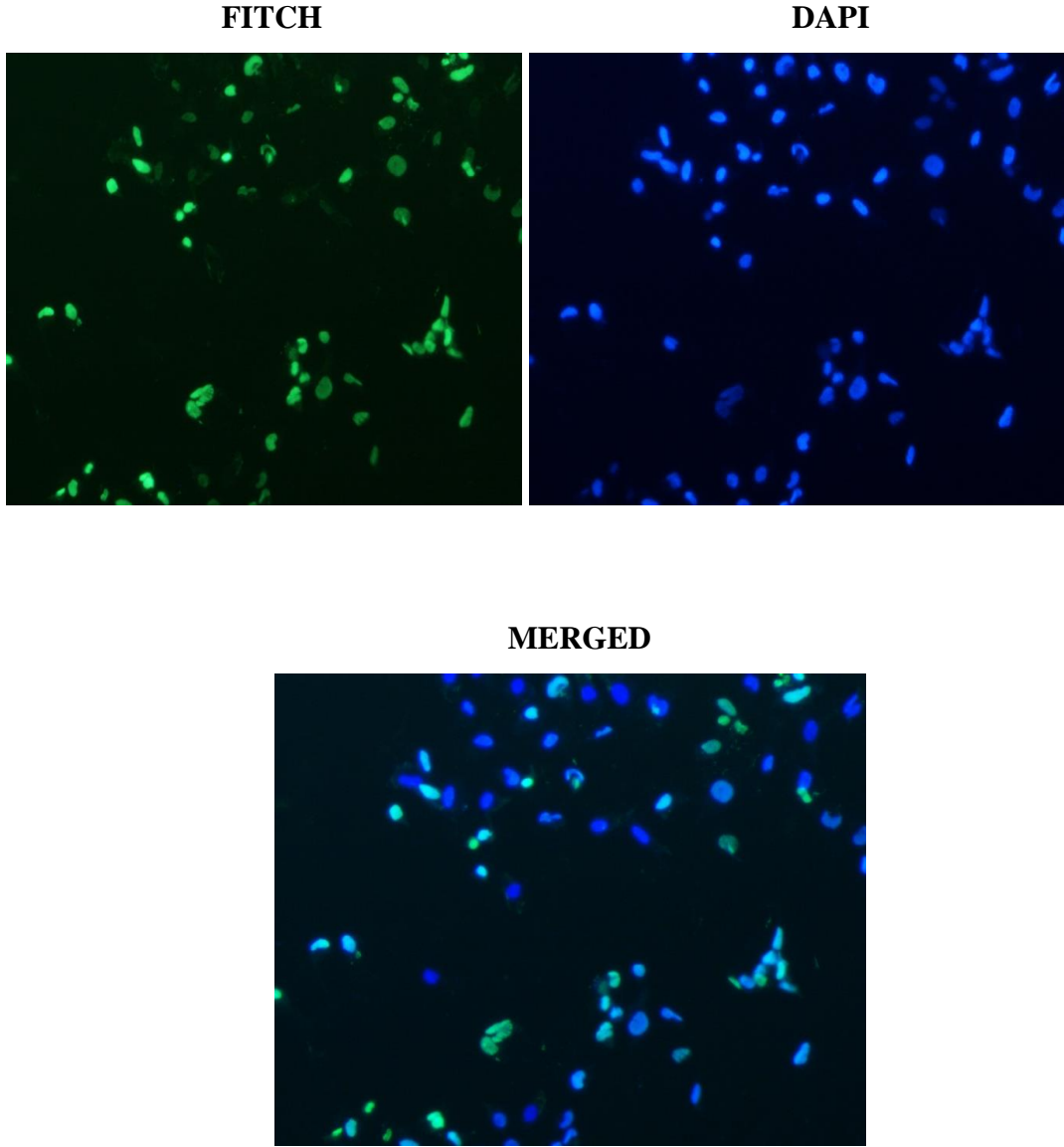
Şekil 4.12. AGS kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki pozitif kontrol (CCl₄) görüntüsü (x40).

AGS USNİK ASİT**FITCH****DAPI****MERGED**

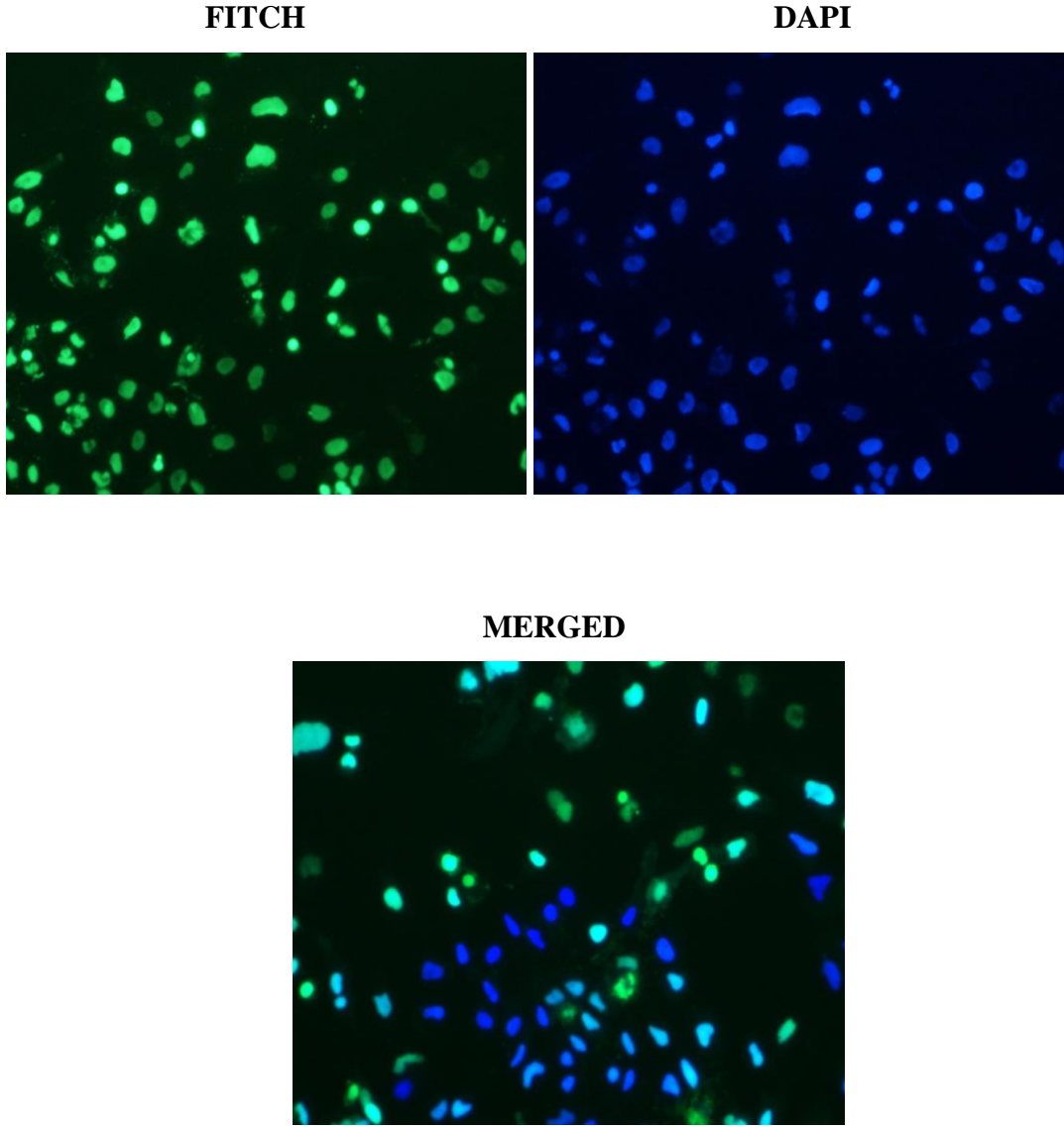
Şekil 4.13. AGS kanser hücrelerinin usnik asit ile muamelesi sonucu invert mikroskoptaki görüntüsü (x40).

HeLa NEGATİF KONTROL

Şekil 4.14. HeLa kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki negatif kontrol görüntüsü (x40).

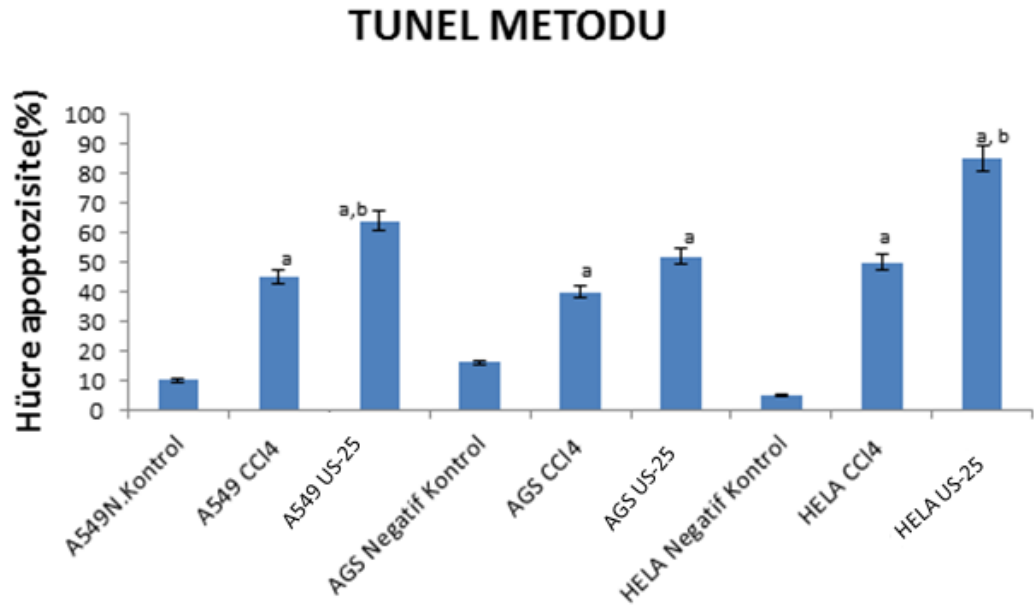
HeLa POZİTİF KONTROL

Şekil 4.15. HeLa kanser hücrelerinin invert mikroskoptaki pozitif kontrol (CCl_4) görüntüsü (x40).

HeLa USNİK ASİT

Şekil 4.16. HeLa kanser hücrelerinin usnik asit ile muamelesi sonucu invert mikroskoptaki görüntüsü (x40).

Çizelge 4.4. 25 µM konsantrasyondaki usnik asitin A549, AGS ve HeLa kanser hatları üzerine apoptotik etkisinin istatistiksel sonucu



*(pozitif kontrolle kıyas ^ap<0.05, usnik asitle kıyaslandığında ^bp<0.05).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Likenler, bitki türlerinden farklı olarak kendilerine ait bir veya birden fazla metaboliti fazla miktarda sentezleyen canlılardır. Bu özelliklerinden dolayı özellikle son yıllarda bilim insanları liken ekstreleri ve bunların metabolitleri üzerine yoğunlaşmışlardır. Bunun sonucunda birçok liken metabolitinin yapısı karakterize edilmiş ve bu metabolitler ile değişik organik çözücülerle elde edilen ekstrelerin farklı biyolojik aktiviteleri ortaya konmuştur (Koçer 2012).

Bunun yanı sıra kemotörapatiklerin istenilen başarıyı sağlayamaması ve antibiyotiğe dirençli patojenik mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturması, antimikrobiyal aktiviteleri açısından pek çok liken sekonder metabolitinin araştırılmasına neden olmuştur (Aydın ve Kınalıoğlu 2010). Bu sekonder metabolitlerin karakterizasyonu ve tanımlamaları yapılarak mutajenik, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin belirlenmesi, insanlarda kanser hastalığının gelişmesini azaltmak için önemli çalışmaları da beraberinde getirmiştir (Roncada *et al.* 2004). Özellikle makromolekülleri içine alan birçok doğal ürün, bireysel immün sisteminin modülasyonunu sağlamasından dolayı antitümör aktiviteye sahiptir. Bu makromoleküllerin, kimyasal antitümör droglarla karşılaştırıldığında daha az yan etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (Silva vd 2006).

Anjiogeneze dayalı olan tümör gelişimi ise, kanser oluşumunda en önemli belirtidir. Bazı antianjiogenez faktörler geleneksel çin bitkilerinden meydana gelmesinin yanı sıra usnik asit de anjiogenezi güçlü derecede önleyici etkiye sahiptir (Song 2012).

Şüphesiz en çok araştırılan, popülaritesi en fazla olan, birçok farklı biyolojik aktivitelere sahip, liken sekonder metaboliti usnik asittir (Güner vd 1992; Brisdelli *et al.* 2013).

Bu tez çerçevesinde yaptığımız çalışmalarda, % 0,5 oranında DMSO ile çözünen usnik asitin 12,5, 25 ve 50 µM lık konsantrasyon aralığında göbek kordonu damar endotel

hücreleri (HUVEC) üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği hatta iyileştirici etkisi olduğu, LDH ve WST-1 metodu kullanılarak belirlenmiş ve kontrole aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. ($p < 0.001$). Ayrıca usnik asitin bu etkisi, kanser hücre hatları sonuçlarımızda HUVEC'i kontrol olarak kullanabileceğimizi göstermiştir.

Usnik asitin özellikle 12,5, 25 μM lık konsantrasyonunda A549 ve HeLa hücre hatları üzerine olan antikanser etkisi LDH ve WST-1 metodları kullanılarak belirlenmiştir ve istatistiksel olarak önemli olduğu açık şekilde görülmüştür. Aksine AGS hücre hatında ise yüksek dozda usnik asit konsantrasyonunun (100-200 μM) antiproliferatif etkiye sahip olduğu fakat konsantrasyona bağlı olarak (50-200 μM) sitotoksiteyi ise artırdığı tespit edilmiştir. Tunel metodu kullanılarak, usnik asitin 25 μM lık konsantrasyonunda üç farklı kanser hücre hattı üzerine olan apoptotik etkisinin özellikle A549 ve HeLa kanser hücre hatlarında olduğu belirlenmiş ve istatistiksel olarak önemli olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan benzer çalışmalarda Backorova *et al.* 2011 farklı liken sekonder metabolitlerinin (parietin, atranorin, usnik asit ve gyroforik asit) hücre siklusunun dağılımı ve S fazında ki hücrelerin çoğalması temeline bağlı olarak 10 farklı kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkisi MTT, klonogenik (HTCA) ve canlılık testlerini kullanarak belirlemişlerdir. En fazla usnik asit (50 μM) ve atranorinin (50 μM) hücre proliferasyonunu ve canlılığını azalttığını ve kullanılan sekonder metabolitlerin, konsantrasyona bağlı olarak her bir kanser hücre hattı üzerine aynı etkiyi oluşturmadığı rapor edilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmanın sonucunda etkili olan maddelerin tümör hücrelerinde ve tümörlü dokularda ilaç olarak kullanımının faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Bu sekonder metabolitlerin biyolojik mekanizması tam olarak bilinmediği için Backorova *et al.* 2012 yaptığı başka bir çalışmalarında farklı dozlara sahip dört farklı liken sekonder metabolitinin (parietin, atranorin, usnik asit ve giroforik asit), A2780 ve HT-29 kanser hücre hatları üzerine olan sitotoksik mekanizmasını araştırmışlardır.

Kaspaz-3 aktivasyonu, mitokondrial membran potansiyeli (MMP), hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) belirlenmesi, nitrojen (RNS) türleri üretimi ve western blot analizi gibi tekniklerle usnik asidin ve atranorinin 50 ve 100 μM 'da antikanser etkisinin daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca usnik asit ve atranorinin genlerin ya da proteinlerin (PARP, p53, Bcl-2/Bcl-x1, Bax, p38, pp38) ifade edilmesine bağlı olarak mitokondriyal bir yolla kanser hücrelerindeki programlı hücre ölüm mekanizmasını aktive ettikleri ve kaspaz-3 aktivasyonunu artırarak etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Buna ilaveten özellikle de usnik asidin p53 genin aktivitesini artırarak antikanser mekanizmasında etkili olduğunu vurgulamışlardır.

Usnik asitin sudaki çözünürlüğünün az olması kanser tedavisinde kullanımını sınırlandırmıştır. Bu sebepten dolayı Noemia Pererira da Silva Santos *et al.* 2006 usnik asidin antitümör aktivitesinin belirlenmesi amaçlanarak poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) polimerleriyle hazırlanan nanokapsüllerin, Sarkoma-180 tümörüne sahip fareye aktarıldığında antitümör etkisinin % 26,4 oranında olduğu, tümörlü dokulara çok hızlı şekilde etki ettiği ve nanokapsüllü usnik asitin kemoterapide kullanılabileceği ve histolojik olarak yan etkilere sahip olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca usnik asitin suda çözülme oranı düşük olduğu için % 0,5 oranında tween80 ile çözüldükten sonra sitotoksik etkisine bakılmış ve nanokapsüllü usnik asidin antitümör ve sitotoksik aktivitelerinin daha fazla olduğu ve tween80'nin diğer çözücülere göre hepatotoksisiteyi düşürücü etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Floehr *et al.* 2010 usnik asidin çözünürlüğünü artırmak için DMF (Dimetilformamid) kullanmış ve DMF nin antioksidan etkisi hariç tutularak usnik asidin hücre canlılığı üzerindeki etkisini hesaplamışlardır. Farklı dozlarda UV-B ışını altındaki insan lenfosit (Jurkat-cell) hücre hattı kullanarak, farklı konsantrasyonlarda usnik asitin pro-oksidan ve antioksidan özelliği Eosin-sitotoksiste ve XTT testleri ile belirlemişlerdir ve hücre hattının düşük dozda UV-B ışını ve usnik asit ile muamelesi sonucunda normal metabolizma ve yüksek oranda hücre canlılık gösterdiği yani antioksidan özelliğe sahip olduğu, aksine yüksek dozda usnik asit ve UV-B ışını altında hücre membranı üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Einarsdottir *et al.* 2010 DMSO çözünen usnik asitin meme kanser hücresi (T-47D) ve pankreas kanser hücresinde (Capan-2) Flow sitometrik analiz ile hücrenin S fazına girişinin engellendiği ve hücre boyutunda azalma meydana getirdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca LDH salınım seviyesinin ölçülmesiyle nekrotik etkinin 48. saatin sonunda olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki kanser hattında da doza bağlı olarak mitokondrial membran potansiyelinde kayıplar görülmüş ve buna bağlı olarak proliferasyon ve hücre gelişimini engelleyici etkiye sahip olduğunu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra Tunel tekniğiyle 20µg/mL lik usnik asitin apoptoz etkisini ölçmüş fakat apoptoza herhangi bir kanıt bulamamışlardır.

Leandro *et al.* 2013 farklı konsantrasyonlarda usnik asitin in vivo ve in vitro olarak fare ve V79 hücre kültürü üzerine genotoksik ve antigenotoksik etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Usnik asitin 60 µg/mL ve 120 µg/mL dozlarında DNA zararına sebep olduğunu comet testi ile ortaya koymuşlar, fakat aynı dozların in vivo test sisteminde genotoksik etkiye sahip olmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmada in vitro koşullarda kemoteröpatik ajan (pozitif kontrol) olarak genotoksisiteye sebep olan metil metanolsülfonat (MMS) kullanımına bağlı olarak kromozomal ve genom zararına karşı usnik asidin koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bazin *et al.* 2008 ise usnik asit ve bazı türevlerinin fare kanser hücre hattına: L1210 (lymphocytic leukaemia-ATCC CCL 219 (lenfositik lösemi)) ve 3LL (murine Lewis lung carcinoma-CRL-1642 (fare akciğer kanseri)), insan kanser hücre hattına: K-562 (chronic myelogenous leukaemia-ATCC CCL-243 (kronik miyeloid lösemi)), DU145 (brain metastasis of a prostate carcinoma-ATCC HTB-81(prostat kanseri)), MCF7 (breast adenocarcinoma - ATCC HTB-22 (meme kanseri)) ve U251 (glioblastoma-RCB-0641) karşı sitotoksik etkisini MTT testi kullanarak belirlemişlerdir. Bu araştırmada usnik asitin sitotoksik etkisinin poliamin taşıma sistemine (PTS) ile alakalı olduğu, ayrıca PTS kanser hücrelerini hızlı bir şekilde parçalama özelliğine sahip olduğu için antikanser ilaçların aktivitesini de artırdığını ifade etmişlerdir.

Kumar KC and Müller 1999 Gyroforik, Usnik ve Diffraktaik Asitin yüksek derecede proliferasyon özelliğine sahip ve model hücre olarak kullanılan kültüre edilmiş HaCaT hücrelerine karşı antiproliferatif etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu maddelerin hücre plazması üzerinde hasar verici etkiye sahip olmadığı sitotoksikite testi olan LDH tekniği ile kontrolle kıyaslayarak belirlemişlerdir. LDH (Laktat Dehidrogenaz) salınım oranının değişmediği ve LDH oranında meydana gelen herhangi bir artışın ise hidroksil radikallerinin üretimiyle ilişkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

Song *et al.* 2013 yaptığı diğer bir çalışmada ise tümör anjiyogenezisi etkileme mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen usnik asitin in vivo koşullarda VEGFR2-mediated AKT ve ERK1/2 signal yollarını baskılayarak tavuk embriyo koriallantoik membran (CAM) testi ile tümör anjiyogenezini güçlü derecede engellediğini ve farenin vücut ağırlığını etkilemeden Bcap-37 meme kanseri tümörünü baskıladığını görmüşlerdir. Aynı araştırmada in vitro çalışmada usnik asidin HUVEC hücre hattında Bcl-x1, canlılık ve kaspaz-3 aktivasyonunu azaltarak MTS (hücre proliferasyon) testi ile hücre proliferasyonunu sınırlandırdığını ve CellTiter96 AQueous aracılığı ile hücreyi apoptoza teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada usnik asitin endotel hücre proliferasyonu, göç ve tübül oluşumunu inhibe ettiği aynı zamanda apoptoza da sebep olduğu ortaya konulmuştur.

Brisdelli *et al.* 2012 farklı konsantrasyonlara (2,5-100µM) sahip usnik asitinde içerisinde bulunduğu altı farklı liken metabolitinin (diffraktaik asit, lobarik asit, usnik asit, vianisin, variolarik asit, protolikhesterinik asit) üç farklı kanser hücre hattı, MCF-7 (breast adenocarcinoma), HeLa (cervix adenocarcinoma) ve HCT-116 (colon carcinoma) üzerine proliferatif, canlılık ve ROS seviyesine bağlı olarak antioksidan etkisini araştırmışlardır. MTT testi sonucunda maddelerin konsantrasyonlarına bağlı olarak variolarik asit üç kanser hattı üzerine antiproliferatif etki göstermezken, usnik asitin en güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya konulmuştur. Ayrıca 40 µM değerindeki protolikhesterinik asitin, HeLa hücre hattında kaspaz-3, 8 ve 9 aktivitesine bağlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Aynı araştırmada kullanılan liken metabolitlerinin hücre içi ROS seviyesini önemli derecede artırmadığı ve HeLa

hücrelerinin inkübasyonda kalma sürelerine bağlı olarak ROS seviyesinin değiştiği rapor edilmiştir.

Sokolov *et al.* 2012 ise ilk kez usnik asitin, MDCK hücrelerinde pandemic influenza virusü A(H1N1) pdm09 'ne karşı mikrotetrazolium testi ile antiviral ve sitotoksik aktivitesini rapor etmişler fakat usnik asidin anti-influenza virüs aktivitesi ve mekanizmasını vurgulamamışlardır.

Singh *et al.* 2013 usnik asitin (25-100 µM), A549 hücrelerinin proliferasyonunu önemli derecede baskıladığını ve hücre gelişim inhibisyonunun G0/G1 fazlarıyla ilişkili olduğunu Flow Sitometrik Analiz yöntemiyle belirtmişlerdir. Usnik asitin, mitokondrial membran depolarizasyonu (ADP-riboz) aracılığıyla hücreyi apoptoza teşvik ettiğini ayrıca usnik asitin CDK4, CDK6 ve siklin D1 protein ifadesini artırdığını ve CDK p21/cip1 ifadesini azalttığını Annexin V ve JC-1 metotlarını kullanarak rapor etmişlerdir.

Kosanic *et al.* 2013 yaptığı diğer bir çalışmada ise *Evernia prunastri* and *pseudo evernia furfuraceae* likenlerinin FeX (insan melanoma) ve LS174 (insan kolon kanser) hücre hattına karşı MTT testi kullanılarak antikanser aktivitesi ve sitotoksik etkisini olduğunu belirlemişlerdir.

Manojlovic *et al.* 2012 tarafından yapılan benzer bir çalışmada üç farklı *Parmelia* cinsine ait liken türünün kimyasal bileşenleri ve onların metabolitlerinin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. HPLC-UV metodu ile bu liken türlerinin kimyasal analizi yapılmış, elde edilen salazinik asitin protosetrarik asit den daha güçlü antioksidan özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada FemX (human melanoma) ve LS174 (human colon carcinoma) hücre hatlarına karşı salazinik asit ve protosetrarik asitin sırasıyla 35, 67 ve 60,18 µg/ml değerlerde güçlü derecede antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Rankovic *et al.* 2012 ise *Toninia candida* ve *Usnea barbata* liken türlerinin ve onların sekonder metabolitlerinin (norstiktik asit ve usnik asit) antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkisini araştırmışlardır. Bu araştırmada norstiktik asit ve usnik asitin iki farklı kanser hücre hattı olan FemX (human melanoma) ve LS174 (human colon carcinoma) üzerinde antikanser aktivitesi olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı araştırmada usnik asidin muamele edilmesinden 24 saat sonra FemX (hücre siklusunun G1 fazında hücre sayısında önemli bir azalma ve G2/M fazında hücre sayısında artıştan dolayı) ve LS174 (hücrelerinin siklus aşamasında, sub-G1fazında önemli artış ve G2/M fazında bir azalışdan dolayı) hücre hatları üzerine apoptotik etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir.

Russo *et al.* 2012 beş farklı liken metabolitlerinin (atranorin, diffraktaik, divarisatik, vikaniksin ve protolikheterinik asit) insan prostat kanser hücreleri üzerine olan antikanser etkisini MTT metodu ve LDH metodu kullanarak belirlemişlerdir. Ayrıca apoptozun ve DNA kırıklarının belirlenmesi için COMET, caspase-3 aktivitesi metodu ve Hsp70 protein ifadesi için western blot analizi kullanılmıştır. (Hsp70 ifadesinin inhibisyonu ile prostat kanser hücrelerini apoptoza teşvik ettiği belirtilmiştir). Bu araştırmada yüksek konsantrasyonda (25 ve 50 μM) atranorin, diffrattaik, divarisatik asitin prostat kanser hücrelerini inhibe etmede düşük aktiviteye sahip oldukları fakat DU-145 ve LNCaP hücrelerinde (6.25- 50 μM) konsantrasyon değişimine bağlı olarak vikanisin ve protolikheterinik asitin apoptotik süreci etkileme aktivitesinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Mitrovic *et al.* 2011 beş farklı liken türünün (*Parmelia sulculata*, *Plavoparmelia kaperata*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia fisodes* ve *Kladonia foliacea*) kolon cancer HCT-116 hücre hattı üzerine olan antioksidatif, antimikrobiyal ve antiproliferatif etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmada *Hypogymnia fisodes* ve *Cladonia foliacea* türlerinin diğer liken türlerinden daha iyi sitotoksik etkiye, en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve bütün liken türlerinin HCT-116 hücre hattı üzerine apoptoz etkisinin olduğu rapor edilmiştir.

O'Neill *et al.* 2010 meme kanser hücre hattı (MCF7) ve akciğer kanser hücre hattı (H1299) üzerine 29 μ M lık usnik asitin, pozitif kontrol olarak kullanılan vincristin (mikrotübül oluşumunu engeller) ve taxol (mikrotübülleri stabilize eder) muamelesine karşı mikrotübüllerde yada mitotik indeks artışında herhangi bir değişime sebep olmadığını ifade etmişlerdir.

Doriana *et al.* 2009 *Evernia prunastri* ve *Xanthoria parietina* liken türlerinin murine myeloma hücreleri (P3X63-Ag8.653) üzerine antiproliferatif etkisini, MTT metodu ile belirlemişlerdir. Ayrıca bu araştırmada *E. prunastri* hücre proliferasyonunu etkilemezken *X. parietina* nin hücre proliferasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Bruno *et al.* 2009 beş farklı liken asitinin (usnik, salazinik, vulpinik, gyroforik, evernik asit) MM98 malignant mesothelioma, A431 vulvar kanser hücreleri ve HaCaT keratinocytes üzerine yara iyileştirme ya da hücre proliferasyon etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmada kullanılan liken asitlerinden usnik asitin yüksek seviyede, vulpinik asidin orta seviyede ve diğer asitlerin düşük seviyede toksisiteye sahip olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca subtoksik dozlarda HaCaT monolayerlar üzerine usnik asit ve gyroforik asitin güçlü yara kapatma etkisinin olduğu, evernik asidin böyle bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Sahu *et al.* 2009 ise farklı konsantrasyonlara sahip usnik asitin, kültürü yapılmış insan hepatoblastoma HepG2 hücreleri üzerine toksik ve metabolik etkisini belirlemek üzere yapmış oldukları araştırmada, 5 μ M ve daha fazla konsantrasyonda usnik asit HepG2 hücrelerinde önemli derecede sitotoksik etki gösterdiği 20 μ M ve daha fazla konsantrasyondaki usnik asit hücre ölümlerine mitokondrial bozukluk, oksidatif stres, Sitokrom P450 aktivitesine değiştirerek sebep olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca usnik asite maruz kalan HepG2 hücrelerindeki inflamasyonla ilgili olan CCL21, proliferasyon ve karsinogenez ile ilişkili olan CCNC, metabolizma ve DNA hasarı ve tamiri ile ilişkili olan UGT1A4, oksidatif ve metabolik stresle ilişkili olan CYP1A1 ve CYP2E1 genlerin ifadesinde değişimler meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak çalışmamızda usnik asitin 12,5, 25 µM lık dozlarının A549 ve HeLa kanser hücre hatlarında antikanser etkiye sahip olduğu fakat AGS kanser hücre hattında ise böyle bir aktivisinin olmadığı belirlenmiştir.

5.1. Öneriler

Geçmişten günümüze kadar, alternatif tıp olarak adlandırılan alanda, tez konusu olarak çalışmış olduğumuz usnik asit ve usnik asitin elde edildiği likenler güçlü antioksidant özelliklerinden dolayı binlerce insan tarafından birçok hastalık için tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. Asırlardır tecrübe edilen usnik asitin, antiproliferatif, sitotoksik ve apoptotik etki mekanizmasının detaylı bir şekilde araştırılması, *in vivo* çalışması yapılarak ayrıca kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesine bakılarak ya da nanoteknolojik uygulamalarla insanlar üzerindeki etki mekanizması aydınlatılabilir.

Elde edilen bilgiler ışığında bu etken maddelerin insan sağlığı için kullanılması ile ticari gelir kazanılması yönlerinden dolayı çalışmaların bu noktaya odaklanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ağar, G., Güllüce, M., Aslan, A., Bozari, S., Karadayı, M. & Orhan, F., 2010. Mutation preventive and antigenotoxic potential of methanol extracts of two natural lichen. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 4(20):2132-2137.
- Ahmadjian, V., 1993. *The Lichen Symbiosis*. John Wiley and Sons: New York.
- Alpsoy, L., Yalvac, ME., 2011. Key Roles of Vitamins A, C, and E in Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress. *Vitamin and Immune System*. Ed: Gerald Litwack, *Vitamins and Hormones*, Vol. 86, Burlington: 287-305. ISBN: 978-0-12-386960-9.
- Anar, M., 2013. Bazı Liken Türlerinin Antimutajenik Özelliklerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Anonymous, 2013. www.roche-applied.com. (21.10.2013)
- Araújo, Adriano A. S., Gelain, Daniel P., Moreira, Jose C. F., Almeida Jackson R. G. S., Quintans, Jullyana S. S., Quintans-Junior, Lucindo J and Santos, Marcio R. V., 2014. Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens. A Systematic Review. *Molecules* 19, 14496-14527; doi:10.3390/molecules190914496.
- Aslan, A., 1995. Erzurum-Kars-Artvin Arasında Yer Alan Bölge Likenleri Üzerine Taksonomik İncelemeler. Doktora tezi, Uludağ üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Bursa.
- Aslan, A., Öztürk, A., Kaya, E., 1998. Likenlerin Ekonomik Önemi ve Oltu Bölgesinden Tesbit Edilen Önemli Liken Türleri. Geçmişten geleceğe Oltu ve Çevresi Sempozyumu, Erzurum.
- Aydın, S., Kınalıoğlu, K., 2010. *P. furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* ve *Parmelina tiliaceae* (Hoffm.) Ach. Liken Ekstraktlarının Antimikrobial Aktivitesi. Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 28100, GİRESUN. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi / The Black Sea Journal of Sciences Sonbahar / Fall: 1 Volume: 1 Number: 2 Sayfa/Page 30,38*.
- Backorova, M., Backor, M., Mikeš, J., Jendzelovsky, R., Fedorocko, P., 2011. Variable Responses of Different Human Cancer Cells to The Lichen Compounds Parietin, Atranorin, Usnic Acid and Gyrophoric Acid. *Toxicology in Vitro*, 25: 37-44.
- Boustie, J., and Grube, M., 2005. Lichens a Promising Source of Bioactive Secondary Metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2): 273–287.
- Backorova M., Jendzelovsky, R., Kello, M., Backor, M., Mikeš, J., Fedorocko P., 2012. Lichen Secondary Metabolites are Responsible for Induction of Apoptosis in HT-29 and A2780 Human Cancer Lines. *Toxicology in Vitro*, 26, 462-468.
- Bağkor, M., Hudak, J., Repcak, M., Zieglers, W., Bağkorova, M., 1998. The Influence of pH and Lichen Metabolites (vulpinic acid and (+) usnic acid) on The Growth of The Lichen Photobiont *Trebouxia irregularis*. *Lichenologist* 30(6): 577–582, Article No. li980166.
- Bayir, Y., Odabasoglu, F., Cakir, A., Aslan, A., Suleyman, H., Halici, M., Kazaz, C., 2006. The İnhibition of Gastric Mucosal Lesion, Oxidative Stress and Neutrophil-infiltration in Rats by The Lichen Constituent DiffRACTAIC Acid. *Phytomedicine* 13, 584-590.

- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi: Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevleri Baskısı, 2. baskı, İstanbul.
- Brisdelli, F., Perilli, M., Sellitri, D., Piovano, M, Garbarino. A, J., Nicoletti, M., Bozzi, A., Amicosante, G and Celenza, G., 2013. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. *Phytotherapy Research. Phytother. Res.* 27: 431–437.
- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., Verotta, L., 2009. Antiproliferative Effects on Tumour Cells and Promotion of Keratinocyte Wound Healing by Different Lichen Compounds. *Planta Medica* 75, 607-613.
- Bessadottir, M., Egilsson, M., Einarsdottir, E., Magnusdottir, I.H., Ogmundsdottir, M.H., Omarsdottir, S., Ogmundsdottir, H.M., 2012. Proton-Shuttling Lichen Compound Usnic Acid Affects Mitochondrial and Lysosomal Function in Cancer Cells. *PLoS One*, 7, e51296.
- Bazin, M.A., Lamer, A.C., Delcros, J.G., Rouaud, I., Uriac, P., Boustie, J., Corbel, J.C., Tomasi, S., 2008. Synthesis and Cytotoxic Activities of Usnic Acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 6860–6866.
- Bruno, B., Elia, R., Andrea, V., Giovanni, A., Federica, P., Luisella, V., 2009. Antiproliferative Effects on Tumour Cells and Promotion of Keratinocyte Wound Healing by Different Lichen Compounds. *Planta Media Pages: 607-613, volume: 75.*
- Culberson, W.L., 1970. Chemosystematics and Ecology of Lichens-Forming Fungi. *Ann Rev Ecol Sys*, 1: 153-70.
- Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, P.L., Sava, G., 2002. A Review on Usnic Acid an Interesting Natural Compound. *Naturwissenschaften*, 89: 137–146.
- Dayan, F.E., Romagni, J.G., 2001. Lichens As a Potential Source of Pesticides. *Pesticide Outlook*; 12: 229-32.
- Dobson F.S., 2000. *Lichens: An Illustrated Guide to the British and Irish Species.* England: The Richmond Publishing.
- Doriana, T., Donatella, C., Antonio, T., Tommaso, P., Silvana, M., Carlo, G., Stefano, L., 2009. Antiproliferative Activity of Lichen Extracts on Murine Myeloma Cells *Biologia Pages: 59-62, volume: 64.*
- Dilsizoğlu, A., Kavuncuoğlu, Z., Oba, D., 2004. Eski ve Yeni Kullanım Alanları, Bilinmeyen Yönleriyle Likenler. *Tübitak Bilim ve Teknik*, 439: 86–89.
- Duman, D.C., 2007. Farklı Liken Örneklerindeki Usnik Asit Miktarlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Belirlenmesi. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(3).
- Einarsdottir, E., Groeneweg, J., Björnsdottir, G., Hardardottir, G., Omarsdottir, S., Ingolfsson, K., Ögmundsdottir, M., H., 2010. Cellular Mechanisms of the Anticancer Effects of the Lichen Compound Usnic Acid. *Planta Med* 76: 969-974.
- Elix, J.A., Adler, M.T., Wardlaw J.H., 1996. A Further Three New Lichen Depsidones. *Australian Journal of Chemistry* 49, 1175-1178.
- Floehr, K. C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J., Truscott, T.G., 2010. Prooxidant and Antioxidant Behaviour of Usnic Acid from Lichens under UVB-light Irradiation – Studies on Human Cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology* 101, 97–10.

- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of Programmed Cell Death *In situ* Via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J Cell Biol*, **119** (3): 493–501.
- Giray, B., Erkekođlu, P., Şahin, G., 2009. Zayıflama Amacıyla Kullanılan Çok Etken Maddeli Bazı Preparatların Toksikolojik Açından Değerlendirilmesi. *Fen-Phen ve Usnik Asit. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Dergisi Cilt 29 / Sayı 2:* ss. 131-148.
- Gökçe, Ö., Yılmaz, A., Gürbüz, V., Konaç, E., Ekmekçi, A., 2011. İnsan Servikal Kanser Hela Hücrelerinde Vinorelbin'in Apoptotik Etkisi. *Gazi Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Cilt 25, Sayı 1, S: 05 – 14.*
- Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecy, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., Schulte-Hermann, R., 1995. *In situ* Detection of Fragmented DNA (TUNEL assay) Fails to Discriminate among Apoptosis, Necrosis, and Autolytic Cell Death: a cautionary note". *Hepatology*, **21** (5): 1465–8.
- Halici M., Odabasoglu, F., Suleyman H., Cakir, A., Aslan, A., Bayir Y., 2005. Effects of Water Extract of *Usnea Longissima* on Antioxidant Enzyme Activity and Mucosal Damage Caused by Indomethacin in Rats. *Phytomedicine* 12, 656-662.
- Huneck, S., 1999. The Significance of Lichens and Their Metabolites. *Naturwissenschaften*, 86: 559–570.
- Huneck, S., Yoshimura, I., 1996. Identification of Lichen Substances: 3-9. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Hauck, M. & Jurgens, S. R., 2008. Usnic Acid Controls the Acidity Tolerance of Lichens Environmental Pollution, 156, 115-122.
- Ingolfssdottir, K., 2002. Usnic acid. *Phytochemistry*, 61: 729-736.
- Ingolfssdottir, K., Lee, S.K., Bhat, K.P.L., Lee, K., Chai, H.B., Kristinsson, H., Song, L.L., Gills, J., Gudmundsdottir, J.T., Mata-Greenwood, E., Jang, M.S. and Pezzuto, J.M., 2000. Evaluation of Selected Lichens From Iceland for Cancer Chemopreventive and Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Biology* 38, 313-317.
- İnal, A., Büyükbaş, S., 2006. Ilımlı Alkol Alan Erkeklerde Laktat Dehidrogenaz İzoenzim Değişiklikleri. *Van Tıp Dergisi*, 13 (3):85-89.
- Johnson, A., Kratz, B., Scanlon, L. and Spivak, A., 2007. Guts & Glory H. pylori: Cause of Peptic Ulcer. *Eukaryon*, Vol 3, February, Lake Forest College.
- Katz, S., 2002. Beneficial Uses of Plant Pathogens. Anticancer and Drug Agents Derived From Plant Pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 10-13.
- Koçer, S., 2012. Liken Metaboliti Usnik Asitin Bazı Aril-Aminofenoller ile Schiff Bazları Türevleri ve Metal Komplekslerinin Sentezi, Antimutajenik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi Kimya Anabilim Dalı, Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kosanic, M., Manojlovic, N., Jankovic, S., Stanojkovic, T., Rankovic, B (2013). Food and Chemical Toxicology. *Evernia Prunastri* and *Pseudoevernia Furfuracea* Lichens and Their Major Metabolites As Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Agents, 53, 112-118.
- Kumar KC, S., Müller, K., 1999. Lichen Metabolites. 2. Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Gyrophoric, Usnic, and Diffractaic Acid on Human Keratinocyte Growth. *Journal of Natural Products*, Vol. 62, No. 6.
- Kohlhardt, F., C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J., Truscott, G.T., 2010. Prooxidant and Antioxidant Behaviour of Usnic Acid from Lichens under UVB-

- Light Irradiation – Studies on Human Cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology, Biology*, 101,97-102.
- Larche, M., 2000. Changes in Interferon-Gamma Production Following Specific Allergen Immunotherapy: Biology vs Methodology. *Clin Exp Allergy* **30**(3): 297-300.
- Landry, J.J. M., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M., Stütz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J.O., Huber, W., Steinmetz, L.M., 2013. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. Volume 3, August 1213.
- Lokajova, V., Bačkorová, M., Bačkor., 2014. Allelopathic Effects of Lichen Secondary Metabolites and Their Naturally Occurring Mixtures on Cultures of Aposymbiotically Grown Lichen Photobiont *Trebouxia Erci* (Chlorophyta). *South African Journal of Botany*, 93: 86–91.
- Leandro, L.F., Munari, C.C., Ferreira.L.S, V.L., Alves, J. M., Oliveira, P. F., Pereira.M, D.F., Lima.M, S.P., Silva.M, T., Oliveira, A., Tozatti, M.G, Cunha, W.R., Tavares, C.D., 2013. Assessment of the Genotoxicity and Antigenotoxicity of (+)-Usnic Acid in V79 Cells and Swiss mice by the Micronucleus and Comet Assay. *Mutation Research* 753, 101– 106.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević I *et al.*, 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *Int J Mol Sci*, 12: 5428-48.
- Mayer, M., O'Neill, M.A., Murray, K.E., Santos-Magalhaes, N.S., Carneiro-Leao, A.M.A., Thompson, A.M., Appleyard, V.C.L., 2005. Usnic acid: A Non-Genotoxic Compound with Anti-cancer Properties. *Anti-cancer Drugs* 16, 805-809
- Ma, L., Chen, Y., Zhang, B., Liu, G., 2014. Increased microRNA-223 in Helicobacter pylori-associated Gastric Cancer Contributed to Cancer Cell Proliferation and Migration. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* Volume 78, Issue 4,
- Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Tomic, S., Stankovic, M., Radojevic, I., Stefanovic, O., Comic, L., Dacic, D., Curcic, M., S., 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *Int J Mol Sci*, 12(8):5428-48. doi: 10. 3390/ijms12085428.Epub Aug 23.
- Mojtahedi, A., Salehi, R., Navabakbar, F., Tamizifar, H., Andalib, A., Ghasemian Safaï, H., Tavakkoli, H. and Farajzadegan, Z., 2007. Apoptosis Induction on AGS Gastric Adenocarcinoma and HEF Fibroblast Cell Lines by Wild Type and cagA or vacA Negative Helicobacter pylori Strains. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 18(3): 203-208. University of Tehran, ISSN 1016-1104.
- Manojlovic, N., Rankovic, B., Kosanic, M., Vasiljevic, P., Stanojkovic, T., 2012. Chemical Composition of three Parmelia Lichens and Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Some Their Major Metabolites. *Phytomedicine* 19, 1166– 1172.
- Nardemir, G., Yanmis, D., Alpsoy, L., Gulluce, M., Agar, G., Aslan, A., 2013. Genotoxic, Antigenotoxic and Antioxidant Properties of Methanol Extracts Obtained from *Peltigera Horizontalis* and *Peltigera Praetextata*. *Toxicology and Industrial Health*, DOI:10.1177/0748233713480207.
- Nash, I., Thomas, H., 1996. *Lichen Biology*. Cambridge University Press 304p, UK.

- Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E., 1996. In situ Apoptotic Cell Labeling by the TUNEL Method improvement and Evaluation on Cell Preparations. *J Histochem Cytochem*, 44 (9): 959–68.
- Negoescu, A., Guillermet, C., Lorimier, P., Brambilla, E., Labat-Moleur, F., 1998. Importance of DNA Fragmentation in Apoptosis with Regard to TUNEL Specificity. *Biomed Pharmacother*, **52** (6): 252–8.
- Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Bayir, Y., Aslan, A., 2006. Gastroprotective and antioxidant Effects of Usnic acid on Indomethacin-induced Gastric Ulcer in Rats. *Journal of ethnopharmacology* 103, 59-65.
- Okuyama, E., Umeyama, K., Yamazaki, M., Kinoshit, Y., Yamamoto, Y., 1995. Usnic Acid and Diffractaic Acid as Analgesic and Antipyretic Components of *Usnea Diffracta*, *Planta Med*, 61, 113.
- O'Neill, M.A., Mayer, M., Murray, K.E., Rolim.S, H.M.L., Magalhaes.S, N.S., Thompson, A.M., Appleyard, V.C.L., 2010. Does Usnic Acid Effect Microtubules in Human Cancer Cells? *Brazilian Journal of Biology* 70, 659-664.
- O'Brien, K.A.F., Smith, L.L., Cohen, G.M., 1987. Inability of A Human Lung Tumour Cell Line to Detect Chemically Induced Organ Toxicity to the Lung. *Toxicology in Vitro*, Volume 1, Issue 2, Pages 85-90.
- Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A.B., Taghizidaj, A.A., Dericci, K., Yılmaz, E., Aras, S., C.Duman, D., 2013. Liken Sekonder Bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70(4): 215-226.
- Plsikova, J., Stepankova, J., Kasparkova, J., Brabec, V., Backor, M., Kozurkova, M., 2013. Lichen Secondary Metabolites as DNA-interacting Agents. *Toxicology in Vitro*, 182–186.
- Park, HJ., Zhang, Y., Georgescu, SP., Johnson, KL., Kong, D., Galper, JB., 2006. Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Offer New Insights into the Relationship between Lipid Metabolism and Angiogenesis. *Stem Cell Rev*, 2(2):93-102.
- Rankovic, B., Misic, M., Sukdolak, S., 2007. Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichens *Cladonia Furcata*, *Parmelia Caperata*, *Parmelia Pertusa*, *Hypogymnia Physodes* and *Umbilicaria Polyphylla*. *British Journal of Biomedical Science* 64, 1-6.
- Roncada, T., Vicentini, V.E.P., Mantovani, M.S., 2004. Possible Modulating Actions of Plant Extracts on the Chromosome Breaking Activity of MMC and in Human lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 18, 617–622.
- Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Vasiljević, P., Manojlović, N., 2012. Biological Activities of *Toninia Candida* and *Usnea Barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 14707-14722; doi:10.3390/ijms131114707.
- Russo, A., Caggia, S., Piovano, M., Garbarino, J., Cardile, V., 2012. Effect of Vicanicin and Protolichesterinic Acid on Human Prostate Cancer Cells. Role of Hsp70 protein. *Chemico Biological Interactions* 195, 1–10.

- Ravinskaya, A.P., 1991. The effect of Ecological Factors on Usnic Acid and Atranorin Contents in the Lichens. In: Golubkova, N.S (ed) The Problems of Experimental Lichenology in the USSR. Komarov Botanical Institute, USSR Academy of Sciences, Leningrad, pp 93-98.
- Shi, Q., Greenhaw, J., Salminen, W.F., 2014. Inhibition Of Cytochrome P450s Enhances (+)-Usnic Acid Cytotoxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *J. Appl. Toxicol*, 34: 835-840, USA.
- Srestha, G., Clair, L.L.St., 2013. Lichens A Promising Source of Antibiotic and Anticancer Drugs. *Phytochem Rev*, 12: 229–244 DOI 10. 1007/s11101-013-9283-7.
- Shahi, S.K., Patra, M., 2003. Microbially Synthesized Bioactive Nanoparticles and Their Formulation Against Human Pathogenic Fungi. *Reviews on Advanced Materials Science* 5, 501-509.
- Sahu, S.C., Amankwa-S, M., O'Donnell Jr, M. W., Sprando, R.L., 2012. Effects of Usnic Acid Exposure on Human Hepatoblastoma HepG2 cells in Culture . *J. Appl. Toxicol*, 32: 722–730 USA.
- Song, Y., Dai, F., Zhai, D., Dong, Y., Zhang, J., Lu, B., Luo, J., Liu, M., Yi, Z., 2012. Usnic Acid Inhibits Breast Tumor Angiogenesis and Growth by Suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 Signaling Pathways. *Angiogenesis* 15: 421–432.
- Silva.S, N. P., Nascimento, S.C., Outtes.W, M.S., Ponthes.F, N.T., Silva, J.F., Castro, C.M.B., Pereira, E.C., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos.M, N.S., 2006. Nanoencapsulation of Usnic Acid: An Attempt to Improve Antitumor Activity and Reduce Hepatotoxicity. N.P. da Silva Santos *et al.* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64.154-160.
- Singh, N., Nambiar, D., Kale, R.K., Singh, R.P., 2013. Usnic Acid Inhibits Growth and Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma A549 Cells. *Nutrition and Cancer*, 65(S1), 36-43.
- Smith, AL., 1975. Lichens. Surrey. England: The richmond publishing Co. Ltd.
- Sokolov. N, D., Zarubaev.V, V., Shtro.A, A., Polovinka.P, M., Luzina.A, O., Komarova.I, N., Salakhutdinov.F, N., Kiselev.I, O., 2012. Anti-viral Activity of (–)- and (+)-usnic acids and Their Derivatives Against Influenza Virus A(H1N1)09. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 ,7060–7064.
- Tamer, A.Ü., Özdemir, A., Türe, C., 1991. Likenlerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma. *Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dergisi* 3, 49-54.
- Thadhani, M. V., M. Choudhary., I. M., Ali, S., Omar, I., SiddiquE, H., Karunaratne, V., 2011. Antioxidant Activity of Some Lichen Metabolites. *Natural Product Research* 25, 1827-1837.
- Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü., Demirel, G.Y., 2013. Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turk J Immunol* 2013;1(3):74-89.
- Ülker, Z., Alpsyoy, L., Mihmanlı, A., 2012. Assessment of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Benzaldehyde Using Different Assays. *Human & Experimental Toxicology*, 1-7.
- Ülker, Z., 2011. Cytotoxic and Genotoxic Effects of *Datura stramonium* Extracts on Cultured Human Lymphocytes. M.S. Thesis – Biology. Fatih University. Istanbul, Turkey

- Yazıcı, K., Aslan, A., 2006. Distribution of Epiphytic Lichens and Air Pollution in the City of Trabzon, Türkiye. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77: 838-845.
- Yazır, Y., Dalkılıç, H., 2012. Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç Endotel Hücre Kültürü. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye. *Koşuyolu Kalp Dergisi*, 15(3):137-142.
- Yamamoto, Y., Miura, Y., Kinoshita, Y., Higuchi, M., Yamada, Y., Murakami, A., Ohigashi, H., Koshimizu, K., 1995. Screening of Tissue-Cultures and Thalli of Lichens and Some of Their Active Constituents for Inhibition of Tumor Promoter-induced Epstein-barr-virus Activation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43, 1388-1390.
- Zeybek, U., John, V., 1992. Likenler, Kimyasal Bileşikleri ve Tıbbi Kullanımları. *Pharmacia-JTPA*, 32(1): 37- 48.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında KARS ta doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini karsta tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2011 yılında biyolog olarak mezun oldu. 2011 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğreniminin 2014 yılında tamamladı.