

**STİKTİK ASİT, SALAZİNİK ASİT VE ATRANORİN'İN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN KÜLTÜR HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Pınar AKCAN YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Kasım - 2014

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1005F112**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Pınar AKCAN YILMAZ'ın “**Stiktik Asit, Salazinik Asit ve Atranorin'in Biyolojik Aktivitelerinin Kültür Hücrelerinde Araştırılması**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 07.11.2014 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. AYŞE TANSU KOPARAL	
Üye :	Prof. Dr. AYŞEN ÖZDEMİR TÜRK	
Üye :	Doç. Dr. FİGEN ÇALIŞKAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

STİKTİK ASİT, SALAZİNİK ASİT VE ATRANORİN'İN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN KÜLTÜR HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Pınar AKCAN YILMAZ

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr Ayşe Tansu KOPARAL
2014, 84 sayfa

Likenler yüzyıllardır geleneksel tedavi yöntemleri için kullanılan canlılardır. Likenler primer ve sekonder metabolitler sentezlerler. Liken sekonder metabolitlerinin; antioksidan, antibiyotik, antienflamatuar, antimikrobiyal, allelopatik, antifungal, herbisit, antimitojenik, antitümör, antimikobakteriyel, antiviral, antioksidan, hücre bölünmesini düzenleyici, analjezik, antiproliferatif, sitotoksik etkileri bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında likenlerden elde edilen sekonder metabolitlerin (Stiktik asit, Salazinik asit ve Atranorin) sitotoksik etkileri (MTT ve LDH testleri ile) ve hücre içi reaktif oksijen seviyelerine (ROS testi) etkileri tek başlarına ve ikili kombinasyon şekline A549 (insan akciğer adenokarsinoma hücresi) ve HUVEC (insan göbek kordonu toplar damarı endotel hücresi) hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Antitümöral etki A549 hücrelerinde koloni oluşum deneyi uygulanarak belirlenmiştir. Anjiyogenez üzerine etkileri HUVEC hücreleri ile yapılan tüp oluşum deneyi sonucunda saptanmıştır. Atranorin'in tek başına ve ikili kombinasyon şeklinde diğer liken sekonder metabolitlerine göre daha sitotoksik, antitümöral ve antianjiyojenik etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Stiktik asit, Salazinik asit, Atranorin, ROS, LDH, anjiyogenez

ABSTRACT**Master of Science Thesis****THE RESEARCH OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF STICTIC ACID, SALAZINIC ACID AND ATRANORIN IN CULTURE CELLS****Pınar AKCAN YILMAZ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Associate Professor Ayşe Tansu KOPARAL****2014, 84 pages**

Lichens are the living beings which are used for traditional treatment methods for centuries. Lichens synthesize primary and secondary metabolites. The secondary metabolites are known to have effects such as; antioxidants, antibiotics, anti-inflammatory, antimicrobial, allelopathy, antifungal, herbicide, antimutagenic, antitumor, antimycobacterial, antiviral, antioxidant, regulatory of cell division, analgesic, antiproliferative and cytotoxic effects.

In this thesis, the cytotoxic effects (with MTT and LDH tests) and intracellular reactive oxygen levels (ROS test) of the secondary metabolites (Stictic acid, Salazinic acid, Atranorin) obtained from lichens were studied single and dual combination by using A549 (human lung adenocarcinoma cell) and HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) cells. Antitumoral effect was determined by using colony formation experiment in A549 cells. The effects on angiogenesis were determined as the result of tube formation experiment done with HUVEC cells. It was determined that, single and dual combination of the atranorin had more cytotoxic, antitumor and antiangiogenic effects than other lichen secondary metabolites.

Keywords: Stictic acid, Salazinic acid, Atranorin, ROS, LDH, angiogenesis

TEŞEKKÜR

Deneysel çalışmalarım ve lisansüstü eğitimim süresince her türlü bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen Uzman Biyolog R. Beklem BOSTANCIOĞLU, Uzman Biyolog Hatice GENÇ, Uzman Biyolog Banu BARUTCA ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayat boyu desteğini benden esirgemeyen babam Mehmet AKCAN, annem Nermin AKCAN, ağabeyim Hüseyin AKCAN'a ve elbette ki her zaman yanımda olan sevgili eşim Cengiz YILMAZ'a sonsuz teşekkürler...

Pınar AKCAN YILMAZ

Kasım, 2014

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1 GİRİŞ	1
1.1 Likenler	2
1.1.1 Stiktik Asit.....	6
1.1.2 Salazinik asit.....	7
1.1.3 Atranorin	8
1.2 Kanser ve Anjiyojenez	9
1.2.1 Kanser.....	9
1.2.2 Anjiyojenez	10
1.2.3 VEGF(Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)	13
1.3 ROS(ReaktifOksijenTürleri)	15
1.4 LDH (Laktat Dehidrojenaz)	18
2 MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
2.2 Kullanılan Sarf Malzemeler	20
2.3 Kullanılan Aletler.....	20
2.4 Deneylerde Kullanılan Hücreler	21

2.4.1 HUVEC hücreleri	21
2.4.2 A549 hücreleri	21
2.5 Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	21
2.6 Kullanılan Test Maddeleri	21
2.6.1 Stiktik Asit.....	21
2.6.2 Salazinik Asit	22
2.6.3 Atranorin	22
2.7 Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması	23
2.8 Yöntem.....	23
2.8.1 HUVEC hücre kültürü.....	23
2.8.2 A549 hücre kültürü.....	23
2.8.3 Hücre sayımları	24
2.8.4 Test maddelerinin hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalar	24
2.9 İstatistiksel Değerlendirmeler	27
3 BULGULAR	28
3.1 HUVEC hücreleriyle yapılan deneyler	28
3.1.1 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının MTT deney sonuçları	28
3.1.2 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının LDH deney sonuçları.....	33
3.1.3 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının ROS üretimine etkileri.....	38
3.1.4 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının tüp oluşumuna etkileri	43
3.2 A549 hücreleriyle yapılan deneyler	48

3.2.1 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının MTT deney sonuçları	48
3.2.2 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının LDH deney sonuçları.....	53
3.2.3 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının ROS oluşumuna etkileri	58
3.2.4 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının koloni oluşumuna etkileri	63
4 TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	Stiktik Asit'in kimyasal yapısı.....	7
1.2.	Salazinik Asit'in kimyasal yapısı.....	8
1.3.	Atranorin'in kimyasal yapısı.....	10
3.1.	Stiktik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	29
3.2.	Salazinik Asit'in in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	30
3.3.	Atranorin'in in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	31
3.4.	Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	32
3.5.	Salazinik Asit ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	33
3.6.	Stiktik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	34
3.7.	Salazinik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	35
3.8.	Atranorin'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	36
3.9.	Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	37
3.10.	Salazinik Asit ve ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	38
3.11.	Stiktik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi.....	39
3.12.	Salazinik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi.....	40
3.13.	Atranorin'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi.....	41

3.14.	Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi.....	42
3.15.	Salazinik Asit ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi.....	43
3.16.	Stiktik Asit'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma üzerine etkilerinin görüntüleri.....	44
3.17.	Salazinik Asit'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma üzerine etkilerinin görüntüleri.....	45
3.18.	Atranorin'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma üzerine etkilerinin görüntüleri.....	46
3.19.	Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma üzerine etkilerinin görüntüleri.....	47
3.20.	Salazinik Asit ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma üzerine etkilerinin görüntüleri.....	48
3.21.	Stiktik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ölçümü ile değerlendirilmesi.....	49
3.22.	Salazinik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ölçümü ile değerlendirilmesi.....	50
3.23.	Atranorin'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ölçümü ile değerlendirilmesi.....	51
3.24.	Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ölçümü ile değerlendirilmesi.....	52
3.25.	Salazinik Asit ve Atranorin kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ölçümü ile değerlendirilmesi.....	53
3.26.	Stiktik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	54
3.27.	Salazinik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	55
3.28.	Atranorin'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	56
3.29.	Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	57

3.30.	Salazinik Asit ve Atranorin kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.....	58
3.31.	Stiktik Asit`in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi.....	59
3.32.	Salazinik Asit`in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi.....	60
3.33.	Atranorin`in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi.....	61
3.34.	Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi.....	62
3.35.	Salazinik Asit ve Atranorin kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi.....	63
3.36.	Stiktik Asit`in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin koloni formasyon deney ile değerlendirilmesi.....	64
3.37.	Salazinik Asit`in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin koloni formasyon deneyi ile değerlendirilmesi.....	65
3.38.	Atranorin`in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin koloni formasyon deneyi ile değerlendirilmesi.....	66
3.39.	Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin koloni formasyon deneyi ile değerlendirilmesi.....	67
3.40.	Salazinik Asit ve Atranorin kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin koloni formasyon deneyi ile değerlendirilmesi.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1.	Deney maddelerinin HUVEC ve A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT, LDH, ROS, Tüp ağı oluşumu, Koloni oluşumu deneyleri ile değerlendirilmesi.....	69
-------------	---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetil sülfoksit
HAMS F-12	: Nutrient Mixture Ham's F-12K
EDTA	: Etilenediamin tetraasetik asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
MTT	: 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
LDH	: Laktat Dehidrojenaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)

1 GİRİŞ

Tıbbi bitkilerin eski çağlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanıldığı bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre, bitki türlerinin yaklaşık 20 000'i tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır (Güllüce ve ark. 2006). Doğal maddelerin ilaç, gıda, parfüm ve boya sanayinde kullanıldıkları bilinmektedir (Ren ve ark. 2009). Doğada bazı organizmaların canlılığını ve büyümesini ürettikleri özel kimyasallar yoluyla kontrol eden ve düzenleyen başka organizmalara ait çeşitli örnekler bilinmektedir (Bačkorova ve ark. 2011).

Likenler, mantar ve algden meydana gelen, dünya çapında yayılış gösteren ve yüksek rakım, direkt güneş ışığı gibi zor çevresel koşullar altında hayatta kalmaya devam edebilen simbiyotik organizmalardır (Devehat ve ark. 2007). Likenler dünya çapında gıda, yem, ilaç, boya, parfüm, baharatlar ve çeşitli amaçlar için kullanılan değerli bitki kaynaklarıdır (Manojlovic ve ark. 2012b). Birçok liken türü Avrupa ülkelerinde mide hastalıkları, diyabet, boğmaca, tüberküloz, kanser tedavisi ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Ranković ve ark. 2008).

Likenler primer ve sekonder olmak üzere iki farklı yapıda metabolitler sentezlerler. Primer liken metabolitleri, diğer mantarlara benzer, hücre metabolizmasında yapısal fonksiyonlara ve rollere sahiptirler. Primer metabolitler hücre içi kökenlidir ve her iki simbiyont tarafından birbirlerinden bağımsız halde sentezlenirler. Primer metabolitler; likenin, izolikenin, hemiselüloz, pektinler, disakkaritler, polialkoller, amino asitler, enzimler, alg kromoforuna benzer klorofil, beta karotenler ve ksantofiller gibi pigmentler özellikle hücre duvarındaki kitinden meydana gelirler. Bunun aksine sekonder metabolitler likenin mantar kısmı tarafında özel olarak üretilir, fungal hücre dışına gönderilir ve tallusun farklı bölgelerinde kristal yapıda biriktirilirler (Shrestha ve Clair 2013).

Liken sekonder metabolitleri organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığında, özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler (Valarmathi ve ark. 2009).

Kanser büyük ölçüde insan sağlığını tehdit eden kompleks bir hastalıktır (Wu ve ark. 2015). Akciğer kanseri, dünya çapında yaklaşık 1.3 milyon kişinin ölümüne neden olan kansere bağlı ölümlerinin başında gelir (Bleau ve ark. 2014). Kanser bir kısım malign hücre üzerindeki normal büyüme kontrolünün kaybedilmesidir (Lucia 2013). Kanser 6 biyolojik belirtisi vardır. Bunlar: proliferatif sinyal, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümüne direnç, ölümsüzlük sağlamak, anjiyojenez, invazyon ve metastazı aktif hale getirmektir (Liu ve ark. 2014).

Anjiyojenez tümörlerin büyümesi ve metastaz gibi patolojik süreçlerde önemli rol oynar. Kanser tedavisinde antianjiyojenik terapinin başarısı, antianjiyojenik maddelerin araştırılmasına öncülük etmiştir. Yeni oluşan kan damarları besin ve oksijen temini ve atık ürünlerin kaldırılması ile kanserin büyümesini destekler (Pund ve ark. 2014). Anjiyojenezin tamamlanmamış olması, kusurlu kan damarı oluşumu ve yetersiz doku onarımı ile ilişkilidir (Whipple ve Korc 2011).

Bu tez çalışmasında, likenlerden elde edilen sekonder metabolitlerin (Stiktik asit, Salazinik asit ve Atranorin) hücre çoğalması, ROS (Reaktif Oksijen Türleri), LDH (Laktat Dehidrojenaz), anjiyojenez ve koloni oluşumları üzerine olan etkileri tek başlarına ve ikili kombinasyon şeklinde A549 (insan akciğer adenokarsinoma hücresi) ve HUVEC (insan göbek kordonu toplar damarı endotel hücresi) hücreleri kullanılarak araştırılmıştır.

1.1 Likenler

Likenlerin oluşumunun 400 milyon yıl öncesine, Erken Devoniyen Dönemi'ne denk geldiği tahmin edilmektedir. Dünyadaki karasal habitatlar arasında en erken kolonileşen ve en başarılı olan simbiyoz formlar likenlerdir (Chen ve ark. 2000). Likenler yüzyıllardır geleneksel ilaç kaynağı olarak kullanılmıştır ve halen dünyanın pek çok yerinde alternatif tedavi için kullanılmaktadır (Pavlovic ve ark. 2013). Likenlerin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi 1940'lı yıllarda *Penicillium notatum*'dan penisilinin ve mantarlardan elde edilen diğer antibiyotiklerin keşfi ile başlamıştır. Birçok liken türünün

mikobakteriler ve gram pozitif bakterilere karşı aktif bileşikler içerdiği bulunmuştur (Ingólfssdóttir ve ark. 2000). Lösemili farelerin kullanıldığı büyük ölçekli bir tarama programı oluşturulmuş ve sonrasında da 60'dan fazla farklı insan kanser hücre hattında *in vitro* taramalar yapılmıştır. Yeni klinik uygulamaların çoğunda kullanılan bitki sekonder metabolitleri ve onların türevleri son 50 yıldır kanseri tedavi etmektedir (El-Seedi ve ark. 2013).

Likenlerin tıbbi kullanımları çok eski zamanlardan beri bilinmekte olup, likenin morfolojik yapısına uygun tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Örn; uzun iplikli bir yapıda olan *Usnea barbata* ve diğer *Usnea* türleri saç dökülmesi ve saç çıkmasında, retikulat bir tallusa sahip *Lobaria pulmonaria* akciğer ve verem hastalığı tedavisinde kullanılmıştır. Benzer şekilde sarı-turuncu renkli bir liken olan *Xanthoria parietina* sarılık hastalığının tedavisinde, kafatası likeni olarak bilinen *Parmelia saxatilis* veya diğer bazı türlerin epilepsi (sara) hastalığının tedavisi, tallusunda küçük siğillere benzeyen tüberküller olan *Peltigera apthosa* pamukçuk hastalığına yakalanmış çocukların tedavisinde kullanılmıştır (Güner 2011).

Mantar ve alg arasındaki simbiyoz ilişkinin sonucu olarak likenlerde yeni metabolitlerin üretildiği bulunmuştur. Bu yeni metabolitler fungal partner tarafından saklanmaktadır ve tallus denilen simbiyont gövdenin yüzeyinde biriktirilmektedir (Bačkorova ve ark. 2011). Liken asitleri denilen bu maddelerin çoğu mantar kökenlidir (Chooi ve ark. 2008) ve mantar hifinin hücre duvarının dış tarafında bulunmaktadırlar (Stark ve Hyvärinen 2003).

Likenler mevalonat, şikimik ve poliketid yolaklar tarafından türetilen çeşitli sekonder metabolitlere sahiptirler (Tokiwno ve ark. 2009). Alifatik, sikloalifatik, aromatik ve terpenik yapıda çok sayıda benzersiz metabolitler oluştururlar (Ren ve ark. 2009). Likenler depsidler, depsidonlar, usnik asit, dibenzofuranlar, ksantonlar, atrakinonlar ve bunlara ek olarak pulvinik asit türevleri ve alifatik asitler gibi birbirinden farklı fenolik bileşikler üretirler (Honda ve ark. 2010). Likene özgü metabolitlerin çoğu, depsidler, depsidonlar ve dibenzofuranlar hepsi okside poliketidlerdir ve asetat polimalonil yolağı aracılığı ile üretilmişlerdir (Fazio ve ark. 2009). Depsidler ve depsidonlar mantar hifinin polisakkarit

matriksinde gömülü olarak suda çözünmeden birikmektedirler. Tallusun yaşı ile birlikte depsidlerin ve depsidonların artma eğiliminde olduğu varsayımı desteklenmiştir (Armaleo ve ark. 2008). Depsid molekülleri kalan bağları ester gruplarıyla bağlanan 2-4 hidroksibenzoik asit molekülünden meydana gelir. Depsidonların depsidlerden daha etkili antioksidanlar olduğu tespit edilmiştir (Manojlovic ve ark. 2012b). Depsidler: atranorin, difraktaik ve lekanorik asitler; depsidonlar: protosetrarik, salazinik, hipostiktik ve norstiktik asitler; ksantonlar: likekstanton ve sekalonik asitlerdir (Honda ve ark. 2010). Bu asitler suda düşük oranda, organik çözücülerde ise yüksek oranda çözünürlüğe sahip sekonder metabolitlerdir (Cabral 2003).

Bazı liken fenollerinin savunma ve saldırıda rol oynadığı ve özellikle de topraktaki mikroorganizmaların ve damarlı bitkilerin üzerindeki liken bileşiklerinin potansiyel allelopatik etkileri olduğu bilinmektedir (Stark ve Hyvärinen 2003). Sekonder metabolitlerin bazı liken türlerinde liken ağırlığının %30'una kadar ulaşması ilgi çekicidir. Liken bileşiklerinin fotobiont hücreleri, likenleri aşırı ışık ve potansiyel toksik metallerle birleşmesine karşı korumaktadır. Bazı liken sekonder metabolitleri (örn; usnik asit) fotobiontdaki hücre bölünmesini engelleyerek tallustaki fotobiont popülasyonunu düzenleyebilir (Bačkorova ve ark. 2012). Likenler, çok sayıda sekonder metabolitler ve pigmentler üretmelerinden dolayı, UV ışığına dayanıklıdırlar ve antioksidanlar kadar filtre görevi görebilirler (Devehat ve ark. 2007; Armaleo ve ark. 2008). Zeytinoğlu ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada *Cetraria aculeata* ekstresinin bakteriyel sistemlerde anlamlı antigenotoksik aktivite gösterdiği ve bazı memeli kanser hücrelerinde sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.

Sekonder metabolitlerin bazı kanser türlerinde apoptozu başlattığı gözlenmiştir (Ren ve ark. 2009). Likenler antibiyotik (Chooi ve ark. 2008; Fazio ve ark. 2009; Ranković ve ark. 2008), antienflamatuar (Chooi ve ark. 2008; Fazio ve ark. 2009), antimikrobiyal (Chooi ve ark. 2008; Tokiwano ve ark. 2009; Cabral 2003; Bačkorova ve ark. 2011), allelopatik (Bačkorova ve ark. 2011), antifungal, herbisit (Tokiwno ve ark. 2009), antimutajenik (Fazio ve ark. 2009), antitümöral (Tokiwno ve ark. 2009; Cabral 2003; Fazio ve ark. 2009; Ranković ve ark. 2008) etkiler göstermiştir.

Ayrıca antimikobakteriyel (Fazio ve ark. 2009), antiviral (Chooi ve ark. 2008; Ren ve ark. 2009; Fazio ve ark. 2009; Ranković ve ark. 2008), antioksidan (Ren ve ark. 2009), antiherbivor (Ren ve ark. 2009; Cabral 2003; Bačkorova ve ark. 2011; Ranković ve ark. 2008), antialerjik (Ranković ve ark. 2008), enzim aktivitesini engelleyici (Ren ve ark. 2009; Fazio ve ark. 2009), fotobiontlarda hücre bölünmesini düzenleyici (Bačkorova ve ark. 2011), güneşin zararlı ışığına karşı koruyucu (Cabral 2003), analjezik, antipiretik, antiproliferatif, sitotoksik etkileri içeren (Chooi ve ark. 2008; Fazio ve ark. 2009), ilaç ve endüstriyel kullanım için birer potansiyel olan çeşitli biyolojik aktivite gösteren farklı dizilişlerde sekonder metabolitler sentezlerler. Likenlere özgü olan sekonder metabolitlerin çoğu mantar kökenlidir, önceki çalışmalarda sadece kültürdeki mikobiontlarda sentezlenebileceği gösterilmiştir (Chooi ve ark. 2008).

Literatürde liken sekonder metabolitlerinin antianjiyojenik etkilerini gösteren iki yayın bulunmaktadır. Bunlarda ilki; Koparal ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmaya aittir. Bu çalışmada *Pseudevernia furfuracea* var. *ceratea* likeninden elde edilen Olivetorik asitin antianjiyojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Song ve ark. (2010) tarafından yapılan ikinci yayında ise ticari olarak satın alınan Usnik asitin antianjiyojenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

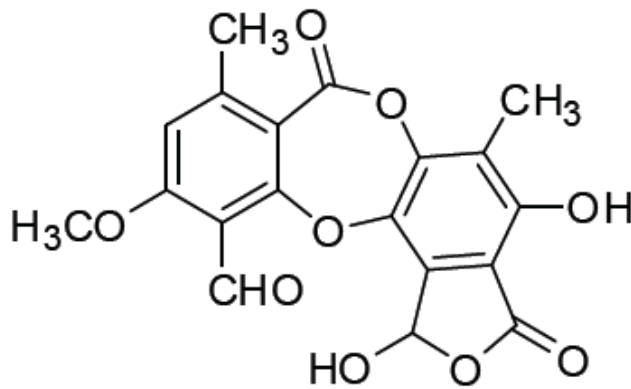
20.0000 türle çiçeksiz bitkilerin büyük bir grubunu oluşturan likenlerin 1000 türünden fazlası Türkiye florasından rapor edilmiştir (Güvenç ve ark. 2012). Likenler ilaç endüstrisinde ya da gıda takviyesinde kullanılabilecek, kolaylıkla ulaşılabilen doğal kaynaklardır (Geyikoğlu ve ark. 2007).

Liken sekonder metabolitlerinin biyolojik rolleri şu şekilde özetlenebilir:

1. Tallusu mikroorganizmalara karşı koruma
2. Fotobiont membranın geçirgenliğini arttırma
3. Çevredeki vasküler bitkilerin fidesinin ve yosunların büyümesini ve çimlenmesini engelleme
4. Ultraviyole ışığı absorbe etme ve fotobiontu yüksek radyasyondan koruma
5. Likenlerle beslenen organizmaları engelleme (Pöykkö ve ark. 2010).

1.1.1 Stiktik Asit

Xanthoparmelia cinsi dünya üzerinde 800'den fazla türe sahiptir, bunların 600'ü sarı-yeşil üst yüzeye sahiptir ve kabuk kısmında usnik ve izousnik asitler içerir. *Xanthoparmelia* olağanüstü bir kimyasal çeşitlilik gösterir. Avrupa türlerinde konstipatik asit, fumarprotosetrarik asit, norstiktik asit, salazinik asit ve stiktik asit olmak üzere 5 farklı kimyasal yapıda tanımlanmıştır. Yaygın, sarmal yapıda, doğrusal uzanan loblara sahip, yüzeyinde küresel çıkıntıları olan ve medullada stiktik asit içeren bir karaktere sahiptir (Melo ve ark. 2011). Stiktik asit *Xanthoparmelia* cinsinde medullada bulunmaktadır (Özdemir Türk ve ark. 2007). Ranković ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada Stiktik asitin antimikrobiyal etkisinin çok düşük olduğu, hücre canlılığını inhibe etmede ise Salazinik asite göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Stiktik Asit'in antioksidan aktivitesinin Salazinik asitten düşük olduğu bulunmuştur (Paz ve ark. 2010). Stiktik asit'in maymun böbrek hücrelerinde (BSC) düşük sitotoksik aktivite gösterirken kemirgen lösemi hücrelerinde (P338) hiç aktivite göstermediği gözlenmiştir (Perry ve ark. 1999).



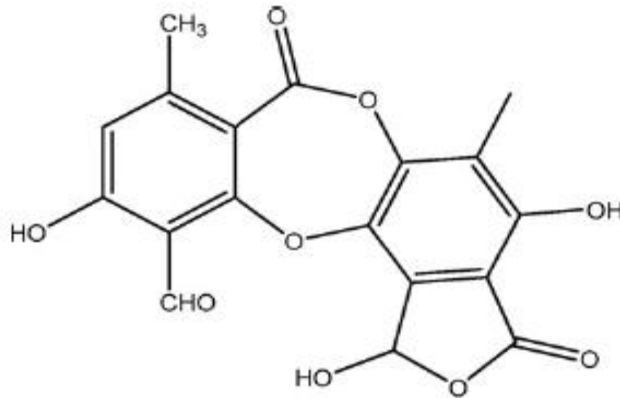
Şekil 1. 1.Stiktik asit'in kimyasal yapısı (Manojlovic ve ark. 2012b)

1.1.2 Salazinik asit

Parmelia sulcata Taylor *Parmeliaceae* familyasında yer alır. Tallus 5-10 cm çapında, çoğunlukla rozet şeklinde ya da düzensiz ve yapaksı formdadır. Substrata gevşek bir şekilde tutunur. Gri-beyazdan, gri-yeşile kadar değişen renk tonlarına sahiptir. Alt yüzey merkezde siyah, kenara doğru kahverengi tonlarındadır. Rizinler basit ya da çatalı bazıları fırça şeklinde dallanmıştır (Karabulut 2010).

Salazinik asitin antimikobakteriyal ve apoptotik etkileri bazı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Salazinik asit'in A431 (insan epidermoid hücre hattı) ve MM98 (malignant mesothelioma hücresi) hatlarında düşük toksisite gösterdiği yara iyileştirme deneylerinde etkisinin az olduğu rapor edilmiştir (Burlando ve ark. 2009).

Daha önce yapılan araştırmalarda Lekanorik asit, Salazinik asit, Stiktik asit ve Usnik asit'in antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Salazinik asit Fem-X (insan melanoma) ve LS174 (insan kolon karsinoma) hücre hatlarında en iyi sitotoksik aktiviteyi sergilemiştir. Özellikle Fem-X hücre hattında Salazinik asit G0-G1 ve G2-M hücre siklus blokajını başlatmıştır (Manojlović ve ark. 2012a).



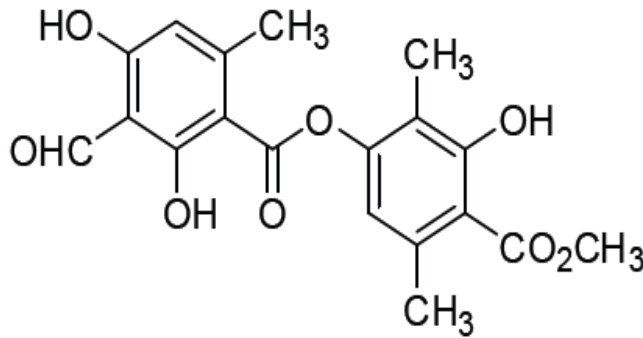
Şekil 1. 2.Salazinik asit'in kimyasal yapısı (Manojlović ve ark. 2012a)

1.1.3 Atranorin

Pseudevernia furfuracea (L) Zopf *Parmeliaceae* familyasında yer alır. Bu türün tallusu karakteristik koyu gri kadifemsi üst yüzey ve siyahımsı alt yüzeye sahip olmasıyla *Evernia sp.* ve *Ramalia sp.* türlerinden ayrılır. Eski Mısır'da mumyaların kokmasını önlemek için kullanılmıştır. *Pseudevernia furfuracea* 1900'lü yıllarda çoğunlukla parfüm endüstrisinde kullanılmıştır. Türkiye'de Kütahya ilinde özellikle Simav'da bu liken kil ile karıştırılarak hızlı iyileşmesi için yaralara uygulanmakta ve ayrıca o bölgede yaşayan insanlar tarafından hemoroidal tedavide de kullanılmaktadır (Güvenç ve ark. 2012). Mısırlılar da ekmek yapımında *Pseudevernia furfuracea*'yi kullanmışlardır (Güner 2011).

Atranorin, depsidler grubunun önemli bir üyesidir ve çeşitli liken türlerinde bulunur. Depsidlerin moleküler yapılarında bağlantı halkasında metil esterler içeren aromatik esterler yer alır (Melo ve ark. 2011). Bačkorova ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada A2780 (insan ovaryum kanseri), HeLa (sevikal kanser), MCF-7 (göğüs kanseri), SK-BR-3 (göğüs adenokarsinoması), HT-29 (kolorektal adenokarsinoma), HCT-116 (kolorektal karsinoma) p53(+/-), HCT-116 p53(-/-), HL-60 (insan akut miyeloid lösemi hücresi) and Jurkat (akut T hücresi lösemisi) hücre hatlarında Atranorin'in çok etkin olduğu ve klonojenik etkiyi inhibe ettiği belirlenmiştir. Atranorin'in SH-SY5Y (insan nöroblastoma) hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığında herhangi bir etkisi olmadığı MTT testiyle gösterilmiştir. H₂O₂ ile indüklendiği zaman SH-SY5Y hücre canlılığının bozulmasına karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (Melo ve ark. 2011). HL-60 hücre hattında 24 saatlik Atranorin uygulanması sonucunda 50µM'lık dozun etkili olduğu ispatlanmıştır. Hücre çoğalmasını inhibe ettiği ve hücre ölümlerini indüklediği yapılan çalışmalar sonucunda belirtilmiştir (Bačkorova ve ark. 2011). Bačkorova ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada HT-29 hücrelerinde Atranorin'in MMP (mitokondriyel membran potansiyeli)'de azalmaya sebep olduğu, ancak sadece 200 µM üzerindeki konsantrasyonlarda 24 saat ve daha fazla süre maruz kalındığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalamaya sebep olduğu belirtilmiştir. Alternatif olarak A2780 hücrelerinde 100 ve 200 µM dozlarında 24 saat ve daha fazla süre test maddesine maruz kaldığında

MMP’de anlamlı azalma görüldüğü belirtilmiştir. Rankovic ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada Atranorin’in güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir. Melo ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada Atranorin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin H_2O_2 ’nin sitotoksik etkilerinden korunduğu, Atranorin’in bütün dozlarında H_2O_2 ’nin etkisini tersine çevirdiği, Atranorin’in hücreler oksidatif stres altındayken antioksidan özellik gösterdiği rapor edilmiştir. Başka bir araştırmada SH-SY5Y hücresi Atranorin ile muamele edildiğinde maddenin anlamlı seviyede oksidatif stres oluşturmadağı belirlenmiştir (Melo ve ark. 2011). Ayrıca Türk ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada *Pseudevernia furfuracea*’nin antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ingólfssdóttir ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada Atranorin’in *Micobacterium aurum*’da antibiyotik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Melo ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada Atranorin’in antinosiseptif (ağrı dindirici) ve antienflamatuar etkilerinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 1. 3.Atranorin’in kimyasal yapısı (Manojlovic ve ark. 2012b)

1.2 Kanser ve Anjiyojenez

1.2.1 Kanser

Kanser, bir dizi kötü huylu hücre üzerindeki büyüme kontrolünün kaybedilmesidir (Lucia 2013). Kanserle ilgili en yaygın bilgi, genetik mutasyonları da içeren iç ve dış faktörlerin sebep olduğu, gelişmiş ülkelerdeki ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olduğudur (Marti-Centelles ve ark. 2013).

İnsan kanserlerinde karsinomalar epitel dokudan meydana gelmektedir. Bazal membran boyunca bağ dokunun içine doğru yayılabilirler ve sonunda metastaz oluşumuna yol açarlar (Risler ve Basan 2013).

Kanseri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler toksisite ve lokal iltihaplanmaya neden olduğu için kullanımı sınırlıdır (Anatole ve ark. 2013). Kanser tedavisindeki zorluklardan en yaygın olanı; ilaç direnci, toksisite ve kullanılan sitotoksik ilaçların düşük özgünlükleridir (El-Seedi ve ark. 2013). Radyoterapi ve kemoterapinin ciddi yan etkileri olduğundan birçok kanser hastası tedavi için alternatif ya da tamamlayıcı yöntemler aramaktadır (Anatole ve ark. 2013). Bu nedenle, kanserli hücreler üzerindeki etkileri bilinen çok sayıda anti-kanser ajanlarını da içeren çeşitli kanser terapileri geliştirilmiştir (Bačkorova ve ark. 2011).

1.2.2 Anjiyojenez

"Anjiyojenez" kelimesi ilk defa Hertigin tarafından 1935 yılında kullanılmış ve mekanizması Folkman tarafından tümör anjiyojenezi çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır (Liu ve ark. 2010).

Yeni kan damarları vaskülojenez boyunca şekillenir, damarların meydana gelmesi embriyojenez ya da anjiyojenez boyunca mezoderm tarafından yeni endotel hücre öncülleri oluşumunu içine alan bir süreçtir (Whipple ve Korc 2011). Vaskülojenez, kan damarlarının başlangıçtaki şeklidir, temel besinler ve besleyici sinyaller ile birlikte organların gelişimini sağlar (Chi ve Wen 2011).

Anjiyojenez, önceden var olan damar sisteminden yeni kan damarlarının oluşumudur (Pund ve ark. 2014). Anjiyojenez, endotel hücrelerin göç kapasitesi edinmesini, bazal membrana inerek ekstraselüler matriks boyunca yayılmasını ve genellikle ekstraselüler matriksin biçimini değiştirmesini içerir. Endotel hücreleri, bütün damarların iç yüzeyini kaplayan tek bir tabaka biçimindedir, anjiyojenik sinyal ile aktive edilir, sentezi uyarılır ve yıkımda görevli enzimleri serbest bırakarak göç etmesine, çoğalmasına ve sonunda kılcal damarların oluşumu için farklılaşmasına izin verir (García-Caballero ve ark. 2013).

Çok sayıda uyarıcı (proanjiyojenik) ve inhibe edici (antianjiyojenik) faktörler tarafından düzenlenen hassas bir dengede bulunur (Chi ve Wen 2011). Normal şartlar altında kan damarları, çok düzenli damar ağları vasıtasıyla bütün dokular için gerekli temel besinleri sağlar (Whipple ve Korc 2011). Yeni damarların gelişimi çok aşamalı karmaşık bir işlemdir (García-Caballero ve ark. 2013). Doğumdan sonra organların gelişmesine katkıda bulunan anjiyojenez, yetişkinlerde sadece ovaryum döngüsünde ve hamilelik boyunca plasentada meydana gelir. İltihaplanma ve oksijen yetmezliği gibi fizyolojik uyarılara karşı ve yara iyileşme süreçlerinde yeniden aktif hale gelmektedir. Retinada lekelenme bozuklukları, eklem iltihabı ve kötü huylu tümörler gibi birçok hastalıkta, denge proanjiyojenik faktörlere doğru kayar ve yeni kan damarları oluşumu meydana gelir (Chi ve Wen 2011).

Antianjiyojenezin bir tedavi aracı olabileceği düşüncesi 1970'lerin başlarına dayanmaktadır. Anjiyojenezin biyolojisini anlama yolundaki ilerlemeler; anjiyojenezin ilettilmesi (örn; koroner ve periferik iskemi, yaraların iyileştirilmesi), veya önlenmesi (örn; tümörlerin büyümesi) için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini olanaklı kılmıştır. Birçok ilaca dirençli tümörlerin de antianjiyojenik kemoterapi ile etkili bir şekilde hedeflenmesi de mümkündür (Ulus 2006).

Anjiyojenik inhibitörlerin keşfedilmesi, karsinomalarda ölüm ve hastalık oranının azalması için umut vermektedir (Senthilkumar ve ark. 2013). Genel bir inanış olarak damar oluşumunun tümör kitlesine dönüşümünü bloke etmek, her ne kadar *in vivo* durumunda çok daha karmaşık olsa da tümörün büyümesini ve metastaz oluşumunu sınırlandırabilir (Jeon ve ark. 2013). Bu nedenle, çoğu anjiyojenez inhibitörleri, antianjiyojenik faktörler olarak yoğun klinik araştırma altındadır (Devehat ve ark. 2007).

Klinik çalışmalardaki anjiyojenik antagonistleri beş sınıfta özetlenebilir:

1. Proteaz inhibitörleri (MMP sentezini engelleyenler)
2. Endotel hücre göçü ve artışı
3. Anjiyojenik büyüme faktörleri
4. Endotel hücre yüzeyindeki integrin gibi matriks proteinler

5. Özgün mekanizmalara sahip inhibitörlerdir (Senthilkumar ve ark. 2013).

Antianjiyojenik ilaçların kullanıldığı bazı klinik çalışmalarda bir miktar olumlu sonuç gözlenmiştir. Kemoterapi ve radyasyon terapisi birlikte kullanıldığı zaman bu ilaçlar hayatta kalma oranını artırma eğilimindedir. Sitotoksik ajanlar ve antianjiyojenik ajanların kanser hücreleriyle birlikte endotel hücrelerini de yok edeceği kanıtlarla desteklenmektedir. Anjiyojenez baskılayıcılarının ve reseptör inhibitörlerinin kullanımı, hem tümörün büyümesi hem de kanserli dokuda yeni damar oluşumunu önlemesi nedeniyle kanser tedavisinde yararlı olabileceği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Senthilkumar ve ark. 2013).

Antianjiyojenik terapilerdeki çalışmalar çok fazladır ve de *in vivo* ortamın özelliklerini yineleyen, *in vitro* düzenlemesindeki birçok faktörü hızlı bir şekilde görüntüleme imkanına sahip bir metodun varlığına ihtiyaç duyulmaktadır (Jeon ve ark. 2013).

Antianjiyojenez, sitoredüksiyondan (kansere hücrelerini ameliyatla azaltma) daha sitostatik (hücre çoğalmasını önleyici) olduğu için son çalışmalar kanser tedavisinde antianjiyojenik ajanlarla sitotoksik kemoterapik ajanların kombinasyonunun daha etkili olduğunu göstermiştir. Antianjiyojenik ajanlar damarları normalleştirip, sitotoksik ilaçların tümöre dağılımını sağlarken endotel hücrelerine doğrudan zarar vererek antianjiyojenik etkileri attırabilir. Kombinasyon terapisi kompleks farmakokinetiklerin farmakodinamik ilişkilerini ve toksikoloji profillerini göstermek, kanser tedavisinde istenen strateji için tekli ajanların sitotoksik ve antianjiyojenik aktivitelerini keşfetmek için genelde klinik olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark. 2013). Araştırmacılar tümör büyümesinin anjiyojeneze bağlı olduğunu ve tümör büyümesindeki her artışın vasküler büyümeyi gerektirdiğini tanımlamıştır. Anjiyojenez yokluğunda tümör etkisiz kalır ve kan desteği sağlandığında hızlı logaritmik bir büyüme meydana gelir. Anjiyojenik inhibitörler dengede olduğunda proanjiyojenik ortamı uyarıcılar değiştirirse tümör anjiyojenik değişimi aktif olmuş gibi görünür. Birçok bilim adamı antianjiyojenik yolların tanımlanması, ayarlanması ve terapötik tedavi için antianjiyojenik ilaçların geliştirilmesine büyük ilgi göstermiştir (Liu ve ark. 2010).

Anjiyojenez üzerinde güçlü etkiye sahip faktörler dört kategoriye ayrılır:

1. Büyüme faktörleri
2. Sitokinler
3. Hücre dışı matriks bileşenleri
4. Hücrelerarası etkileşimler (Liu ve ark. 2010).

Bu anjiyogenik faktörlerin endotel hücrelerinde doğrudan ya da dolaylı etkilemeyi, bir dizi kompleks olayın kofaktörü olmak ya da bir doku reaksiyonunu başlatmak gibi bağımsız faaliyetleri olabilir.

1.2.3 VEGF(Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) gibi bazı doğrudan etkili faktörler endotel hücrelerde tüp oluşumu, hücre çoğalması ve göçünü uyarabilir. Tümör Nekroz Faktör (TNF-a) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF-a) gibi dolaylı faktörler ve mast hücreleri, makrofajlar ve bazen de lenfositler gibi endotel hücre büyüme faktörünü serbest bırakarak konak hücreleri harekete geçirebilirler (Liu ve ark. 2010).

VEGF, en güçlü damar geçirgenliği olan maddedir ve etkisi histaminden 50.000 kez daha güçlüdür. VEGF tümör anjiyojenezinde kritik rolü olan önemli bir anjiyogenik sitokindir ve malignite tümörlerin metastazı ve istilasıyla ilişkilidir, anjiyojenezi teşvik eder ve damar geçirgenliğini artırır. VEGF'de yeni kan damarının oluşumuna aracılık eden çok fonksiyonlu sitokinler kritik rol oynar ve tümör yayılmasının ve metastazının bir göstergesi olarak kabul edilir (Liu ve ark. 2010). Tümör endotelinde oksijen yetersizliği ve ligand konstrasyonundaki artıştan dolayı VEGF reseptörlerinde artış gözlenir. VEGF-2 reseptörü endotel hücrelerin VEGF tarafından uyarıldığının sinyalini veren önemli bir reseptördür. Ligandın bağlanması üzerine, VEGF-2 reseptörü otofosforilasyona maruz kalır, parakrin ve otokrin yollar boyunca her ikisine de katılarak tümör büyümesi ve metastazı teşvik etmek için aktive olur. Anjiyogenik faktörler proteolitik işlem boyunca MMPları (matriks metaloproteinaz) aktive ederler. MMPların endotel

hücrelerinde yüksek aktivitesi, VEGF ve EGF gibi kılcal tüp oluşumunu uyaran anjiyojenik faktörleri tek başına serbest bırakabilir. Bu nedenle, anjiyojenik moleküllerin uyarılmasını engellenmesi tümör hücrelerinde anjiyogenez etkili bir biçimde azaltır. Kanserli tümör hücrelerinde büyümeyle ilişkili moleküllerin serbest kalmasıyla vasküler endotel hücrelerine sinyaller gönderilir ve anjiyogenez başlar. Bu, çeşitli düzenleyici proteinler, proanjiyojenik uyarıcılar, endotel hücre aktivasyonunun yanı sıra hücre çoğalması ve hücre göçü arasında bir etkileşim içerir. Anjiyogenez uyarıcı faktörlerden EGF reseptörü, VEGF, VEGF reseptörü ve MMP gibi bir düzineden fazla farklı molekül tespit edilmiştir. EGF reseptörü, vasküler endotel hücrelerde anjiyogenez ve hücre çoğalmasının öngörülmesinde önemli bir anjiyogenez büyüme faktörüdür (Sun ve ark. 2011).

Tümör damarlanması, anjiyogenez ve varolan tümör kan damarlarını içerir, tümörün varlığını sürdürmede, metastazda ve büyümesinde önemli rol oynar. Tümör damarlanmasının hedef alınması antitümör terapi için çekici bir kavram haline gelmiştir. Antianjiyojenik ve damarın yapısını bozan tedaviler tümör damarlanmasına odaklanılarak antikanser tedavilerinde kullanılmıştır. Tümör anjiyogenez önceden varolan bir damardan yeni damarların gelişmesidir. Tümörlerin çoğu yeni damarlar olmadan 1-2 mm³'lük mikroskop boyutunun ötesinde büyüyemez. Antianjiyojenik aktivite gösteren 300'den fazla madde belirlenmiştir ve bu moleküllerin yaklaşık 40 tanesinin klinik çalışmaları halen devam etmektedir. Bu antianjiyojenik ilaçların kansere karşı etkili olmalarına rağmen, köklü tümörler içinde mevcut tümör kan damarları üzerinde minimal etkileri vardır ve büyük tümörlerde sınırlı aktivite gösterirler (Jiang ve ark. 2013).

Miyokard enfarktüsü ya da felç durumlarını takip eden yara iyileşmesi ve lokal kan dolaşımının kesik olduğu bölgelerin normale dönmesinde anjiyogenezin uyarılması gerekir. Kanser ve diyabet antianjiyojenik terapinin hedeflendiği durumlardır. Bunlara ek olarak anjiyogenez doğrudan ya da dolaylı olarak bağlı olan 70'den fazla hastalık bilinmekte ve bu liste büyümeye devam etmektedir. Anjiyogenezin biyolojisi daha iyi anlaşılırsa bu hastalıkların tedavisi için yeni hedefler ortaya çıkabilir (Jeon ve ark. 2013).

1.3 ROS (Reaktif Oksijen Türleri)

Oksidatif stres, ROS üretimindeki fazlalık ve\ya da antioksidan azalmasına bağlı olarak bu kritik denge bozulduğu zaman meydana gelir. Çalışmalar göstermektedir ki birçok kemoterapötik ajan tümör hücrelerine karşı seçici toksik olabilir çünkü zaten çok stresli olan hücrelerde ROS üretimi çoğalır ve oksidatif stres artar (Anatole ve ark. 2013).

Reaktif oksijen türleri yüksek konsantrasyonlarda üretildiği zaman, hücresel prooksidant-antioksidant dengesi bozulur ve oksidatif stres denilen duruma neden olur. Artan ROS, lipit, protein ve DNA gibi temel moleküllerde oksidatif hasara neden olur, hücrenin hayati fonksiyonlarını engeller. Bununla beraber düşük konsantrasyonlarda üretildiği zaman ikincil haberci olarak sinyal iletim yollarında hücre büyümesini, farklılaşmasını, inflamasyonu, immün yanıtı, hücrenin hayatta kalmasını ve ölmesini düzenleyici olarak görev yapabilir. ROS'un asıl kaynağı mitokondridir, aerobik solunum boyunca mitokondriyal elektron taşıma zinciri (mETC) aracılığıyla O₂ üretir (Romero ve Agostinis 2014).

Apoptoz, intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) yolların ikisini de içerir, tümörler duyarlı olmasından dolayı dışsal yolak yerine içsel yoldan daha çok meydana gelir. Hücresel apoptotik programı doğrudan etkinleştirme yeteneğinde olan mitokondri apoptozun intrinsik kaynaklı en önemli bileşigidir. Mitokondri çoğunlukla hücrede redoks seviyesi ile ilişkilidir ve enerji üretimi, hücre çoğalması ve ölümü gibi birçok hücresel işlevde de rol oynar (Anatole ve ark. 2013).

Oksidatif stres, metabolizma ve ROS oluşumu arasında "dengesizlik durumu" olarak karakterize edilir, ROS seviyesinin artmasına katkıda bulunarak hücresel antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliğini azaltır. Kronik koşullar altında oksidatif stres oluşumu, ROS birikmesi ve doku toksisitesi tarafından hücresel makromoleküller (proteinler, lipitler, DNA vb.) zarar görür, hücre canlılığı ve fonksiyonu geri döndürülemez şekilde değişir (Ziech ve ark. 2012).

ROS'un kaynakları boldur, içsel (mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, P450 metabolizması, peroksizomlar, makrofaj ve nötrofillerin aktivasyonu) ve dışsal kaynaklar (ksenobiyotiklere maruz kalmak, tütün ya da sigara dumanı, c-radyasyonu, ultraviyole A ve B, klorlu bileşikler, poliklorlu bifeniller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, piperonil bütoksit, benzin gibi uçucu organik bileşikler...) içerir. Altında yatan mekanizmaların henüz açıklanamamasına rağmen, endojen ve ekzojen kaynaklara kronik olarak maruz kalındığında, ROS hücre içi antioksidan savunma sisteminin bozulmasına öncülük eder. Çoklu moleküller ve hücresel olaylar normal bir hücrenin kötü huylu bir hücreye dönüşmesiyle ilişkilidir, oksidatif stresin karsinogenezin başlamasında önemli bir modülatör olduğu kesin olarak belirlenmiştir (Ziech ve ark. 2012).

Çeşitli kanser hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda kanser kemoterapötik ilaçlarının, kısmen ROS oluşumunu uyarması yoluyla, tümör hücre apoptozunu tetikleyebildiği belirtilmiştir. ROS normalde bütün aerobik hücrelerde biyokimyasal antioksidanlarla denge içinde bulunur (Anatole ve ark. 2013). Abid-Essefi ve ark. (2012) yaptıkları araştırmada ROS üretiminin apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Liken sekonder metabolitlerinin farklı hücre hatlarında ROS üretimini indüklediği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Pavlovic ve ark. 2013).

Oksidatif stres, ROS üretimindeki fazlalık ve\ya da antioksidan azalmasına bağlı olarak bu kritik denge bozulduğu zaman meydana gelir. Çalışmalar göstermektedir ki birçok kemoterapötik ajan tümör hücrelerine karşı seçici toksik olabilir çünkü zaten çok stresli olan hücrelerde ROS üretimi çoğalır ve oksidatif stres artar (Anatole ve ark. 2013).

Gen ekspresyonu, farklılaşma ve hücre çoğalması gibi pek çok önemli hücresel olayın düzenlenmesinde ROS etkilidir. Hücre ölümü kısmen mitokondrinin fonksiyonunun bozulmasına bağlıdır, bu da ROS üretiminin artması ile ilgilidir. Hücrenin membran geçirgenliği azalır ve sonra da hücre ölüm araçları mitokondri tarafında serbest bırakılır (Pavlovic ve ark. 2013).

Genel olarak oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ve karşıt antioksidan savunması arasındaki dengesizliği ifade eder. ROS seviyesindeki artışın, karsinogenez dahil bir dizi hastalıkla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. ROS sadece hücresel makromoleküllerin (proteinler, lipitler, DNA vb.) hasarını başlatmaz, hücrenin antioksidan kapasitesini de etkili bir şekilde bozar (Ziech ve ark. 2012). Bu nedenle, antioksidan savunma hücre içindeki dengenin korunmasında çok önemlidir, bunların bozulması kanserojen uyarımı, tümör büyümesi ve metastaz ile ilişkilidir. Antioksidanların ve doğal ürün kaynaklı bileşiklerin antioksidan etkisi ile oksidatif stresi etkisizleştirdiği ve böylece ROS'a bağlı tümör oluşumunu önlediği ileri sürülmektedir. Bu amaçla, birçok doğal ürünün biyoaktif moleküller vasıtasıyla, karsinogenez de içeren oksidatif DNA hasarlarına karşı koruyucu etki gösterdiği varsayılmaktadır (García-Caballero ve ark. 2013).

ROS'un aslında hücre ölümü gibi olumsuz ve zararlı hücresel etkilere sebep olduğu düşünülüyordu, şimdi ise konak savunma genleri, kinazların/fosfatazların aktivasyonu, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi ve iyon taşıyıcıları harekete geçirmesini de kapsayan önemli etkilerinin de olduğunun farkına varıldı. ROS'un Ca^{+2} seviyesini arttırdığı, protoonkogen ve proinflamatuvar gen ekspresyonunu ve aktivitesini yeniden düzenlediği belirlenmiştir. Reaktif oksijen türleri O_2 ve H_2O önderliğinde oksidatif reaksiyonu (redoks) azaltmada ara ürün olarak üretilirler. Sinir sistemi hücreleri tarafında üretilen ROS'da, O_2 ve H_2O_2 'nin özellikle önemli olduğu görülür. Biyolojik sistemlerde O_2^- kısa ömürlü olduğundan süperoksik dismutaz (SOD) tarafından hızlı bir şekilde H_2O_2 'ye dönüşür. O_2^- ve H_2O_2 farklı kimyasal özelliklere sahiptir. O_2^- elektrik yüklüdür, son derece reaktiftir, hücre zarı geçirimsizdir, H_2O_2 içinde hızlı değişmez, konsantrasyonu pikomolar-nanomolar aralığındadır ve hücre içi haberci olarak görev yapar. Bunun aksine H_2O_2 daha az reaktif, daha stabildir, konsantrasyonları yüksek nanomolar-mikromolar aralığındadır, hidrofobik membran boyunca yayılır ve dolayısıyla H_2O_2 intra ve inter selüler haberci olarak hareket edebilir. ROS'un farklı türleri çeşitli sinyal yollarını aktive edebilir, farklı ve karşıt potansiyeli olan biyolojik yanıtlara yol açabilir (Touy 2004).

Oksidatif stres tarafından indüklenen ROS, apoptotik ya da nekrotik hücre ölümüne yol açabilir (Pallela ve ark. 2010). Kısa dalgaboylu radyasyon koşullarında likenlerin dikkate değer bir hayatta kalma imkanları vardır. Ultraviyole ışınları (UVA [315–400 nm], UVB [280– 315 nm] ve UVC [200–280 nm]) oksiradikallerin zarar görmesine neden olur. Likenlerin oksidatif stresin hasarlarından kendilerini koruduğu bilinmektedir (Kohlhardt-Floehr ve ark. 2010).

Bazı liken bileşiklerinin oksiradikalleri temizleyebileceği ve bunun sonucu olarak da tallusu koruyabileceği bilinmektedir. Bu bilim insanlarının dikkatini çekmektedir çünkü oksiradikaller cilt yaşlanmasını ve kanseri başlatabilmektedir (Kohlhardt-Floehr ve ark. 2010).

1.4 LDH (Laktat Dehidrojenaz)

LDH aktivitesi genel toksisite değerlendirmesi amacıyla yapılır (Zhu ve ark. 2012). Hücre zarının bütünlüğü hasar gördüğü zaman LDH salınımında artış olur. Bu nedenle, LDH salınımı hücre hasarının düzeyini gösterir. Normal şartlar altında, hücreler öldüğü zaman, az miktarda LDH hücre dışına çıkar, kültür medyumunda LDH aktivitesi maddelerin sitotoksik etkilerini yansıtabilir (Wang ve ark. 2012).

LDH NAD'a bağımlı pürivatın laktata dönüşümünü katalizleyen, glikolitik metabolizma ile ilişkili tetramerik bir enzimdir (Washington ve ark. 2014). LDH aktivitesinin ölçülmesi NADH varlığında laktat ve NAD^+ oluşturması için pürivat indirgenmesini kataliz etme yeteneğine dayanır (Shawky ve ark. 2014). LDH zarın hasar görmesi üzerine açığa çıkan, hücre hasarı ve ölümünün teşhisinde de belirleyicidir (Kobashigawa ve ark. 2014).

Hematoloji, onkoloji ve kardiyoloji de dahil çeşitli alanlarda serumdaki LDH'nın değerlendirilmesinin faydalı olduğu kabul edilmiştir. LDH ve neoplastik hastalık arasındaki ilişkiyi göz önünde tutarak, LDH'nın hastalık aktivitesiyle ilişkili oldu gösterilmiştir ve LDH'daki yüksekliğin birçok hemotolojik ve hemotolojik olmayan kanserlerde, non-Hodgkin lenfoma, üreme hücresi

tümörleri, çoklu miyelom, nazofarenks kanseri ve melanoma dahil olumsuz belirti göstergesi olduğu kabul edilmiştir (Fitzgerald ve ark. 2014).

Kanser hücreleri glikozu öncelikle glikoliz yoluyla metabolize eder. Glikolizin birçok tümör hücresinde normal seviyede oksijen varlığında bile meydana geldiği bilinmektedir. Normal hücreler, oksijen kaynaklarını oksidatif fosforilasyon sınırladığı zaman (örn; kasın şiddetli çalışması) enerji üretimi için glikolizi kullanırlar (Dragovich ve ark. 2014).

Aerobik glikolizin normal konak dokular üzerinde minimal etkiye sahip olduğu, kanser hücrelerinde ise tümör büyümesi ve çoğalmasını engellediği düşünülmektedir. Glikoliz son aşamada LDHA (LDH-M ve LDH-5 olarak da bilinir) tarafından katalizlenir, LDHA hücre sitosolünde pürivatı laktata dönüştüren homotetramerik bir enzimdir. Enzim, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH)'in indirgenmiş halini kofaktör olarak pürivat keton kısımdan bir hibrit transfer ederek kullanır. Bu enzim laktatı pürivata dönüştüren ters reaksiyonu katalizler, bu dönüşüm LDHB (LDH-H ve LDH-1 olarak da bilinir, alternatif bir LDH izoformudur) tarafından gerçekleştirilebilir. Yüksek LDHA seviyeleri birçok kanser ile ilişkilidir ve sıklıkla da hayatta kalmanın düşük olduğu öngörülür (Dragovich ve ark. 2014).

2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

RPMI-1640 medyum (Sigma), Nutrient Mixture Ham's F-12 K (Sigma), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), Endothelial Cell Growth Supplement (Sigma), Sodyum Bikarbonat (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Meck), Triton X-100 (Sigma), MTT (Methylthiazoletetrazolium= Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma), 10X Trypsin-EDTA solüsyonu (Sigma), Matrigel Basement Membrane Matrix (BD), LDH kit (Roche), ROS kit (Cell Biolabs), Endotel Cell Basal Medium-2 (EMB-2) (Cambrex Bio Sciences), Select agar (Sigma).

2.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

25cm²'lik ve 75 cm²'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), steril 1000 ml hacminde filtreler, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler, Thoma lamı, çeşitli cam malzemeler, cam mezürler, cam beherler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde).

2.3 Kullanılan Aletler

Eliza Cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), Inverted Mikroskop (IX71 Olympus), 12 Kanallı mikropipet (eppendorf), otoklav, dağıtıcı pipet (eppendorf), soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), sıvı azot kapları, kuru hava sterilizatörü (Nüve), derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, su banyosu (Clifton), CO₂ inkübatörü (Heraus), steril kabin (Heraus), otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), manyetik karıştırıcı.

2.4 Deneylerde Kullanılan Hücreler

2.4.1 HUVEC hücreleri

HUVEC (insan göbek kordonu toplar damarı endotel hücresi) hücreleri ATCC (American Type Culture Collection)'den satın alınıp stoklanmıştır.

2.4.2 A549 hücreleri

1972 yılında D.J. Giant ve ekibi tarafından 58 yaşında bir erkekte alınan akciğer tümöründen üretilmiştir. 1976 yılında, altmış sekizinci pasajı M.Lieber tarafından American Type Culture Collection'da stoklanmıştır. Japanese Cancer Research Resource Cell Bank (JCRB) ve Riken Cell Bank (RCB) ATCC'den hücreyi almış ve stoklamış daha sonrada birçok Japon araştırmacıya dağıtmıştır. Projede kullanılan hücreler Institute of Fermentation Osaka (IFO), Japonya'dan satın alınıp stoklanmıştır.

2.5 Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyo ile kaplanarak otoklavda 121°C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de yine alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat süre ile steril edilerek kullanılmıştır.

2.6 Kullanılan Test Maddeleri

2.6.1 Stiktik Asit

Xanthoparmelia isidiovagans *Parmeliaceae* familyasında yer alır. Stiktik asit bileşiği *Xanthoparmelia isidiovagans* likeninden izole edilmiştir. Eskişehir Bozdağ'da Tandır Köyü batı mevkiinde 1230 metre yükseklikten toprak üzerinden Doç. Dr. Mehmet Candan tarafından toplanan ve tayin edilen *X. isidiovagans* türü likenler Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda

(ANES) örnek olarak saklanmıştır. Çalışmada kullanılan likenler havada kurutma yöntemi ile kurutulmuş ve izolasyon işlemleri Doç.Dr. Turgay Tay tarafından yapılmıştır.

Kurutulmuş likenlerden 20 gr tartılarak 100 ml etanol, aseton, dietil eter, petrol eter ve kloroformda çözülmüş ve karışım 30 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Bir gece oda sıcaklığında bekletilen karışım Whatman No 1 kağıdı ile filtre edilmiştir. Filtre edilen solüsyon 0,45 µm filtre ile sterilize edilmiş ve çözücü solüsyon rotavapor ile uçurulmuştur (Yılmaz ve ark. 2004).

2.6.2 Salazinik Asit

Parmelia sulcata Taylor *Parmeliaceae* familyasında yer alır. Salazinik asit bileşiği *Pamelia sulcata* likeninden izole edilmiştir. Eskişehir Bozdağ Tandır Köyü batı mevkiinde 1350 metre yükseklikten *Quercus* sp. üzerinden Doç. Dr. Mehmet Candan tarafından toplanan ve tayin edilen *Parmelia sulcata* türü likenler Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (ANES) örnek olarak saklanmıştır. Çalışmada kullanılan likenler havada kurutma yöntemi ile kurutulmuş ve izolasyon işlemleri Doç. Dr. Turgay Tay tarafından yapılmıştır.

Hava ile kurutulmuş likenlerden 10 g tartılarak 100 ml metanol, aseton, dietil eter, petrol eter ve kloroform çözücüler eklenmiştir. Karışım bir saat sonikasyona tabi tutulmuştur. Bir gece oda sıcaklığında bekletilen karışım filtre edilmiştir. Filtre edilen çözücü solüsyon rotavapor ile uçurulmuştur (Candan ve ark. 2007).

2.6.3 Atranorin

Pseudevernia furfuracea var. *furfuracea* (L) Zopf *Parmeliaceae* familyasında yer alır. Atranorin bileşiği *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* likeninden izole edilmiştir. Eskişehir Bozdağ Şoförler Çeşmesi mevkiinde 1200 metre yükseklikten *Pinus nigra* türünün gövdeleri üzerinden Doç. Dr. Mehmet Candan tarafından toplanan ve tayin edilen *P. furfuracea* var. *furfuracea* türü

likenler Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (ANES) örnek olarak saklanmıştır. Çalışmada kullanılacak likenler ise havada kurutma yöntemi ile kurutulmuş ve izolasyon işlemleri Doç. Dr. Turgay Tay tarafından yapılmıştır.

Kurutulmuş likenlerden 20 gr tartılarak 100 ml etanol, aseton, dietil eter, petrol eter ve kloroformda çözülmüş ve karışım 30 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Bir gece oda sıcaklığında bekletilen karışım Whatman No 1 kağıdı ile filtre edilmiştir. Filtre edilen solüsyon 0,45 µm filtre ile sterilize edilmiş ve çözücü solüsyon rotavapor ile uçurulmuştur (Yılmaz ve ark. 2004).

2.7 Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

Stiktik asit, Salazinik asit ve Atranorin, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 50-100-200-300-400 µM'lık dozlar hazırlanmıştır. Test maddeleri, DMSO içinde çözüldüğü için negatif kontrol olarak çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. Stok çalışma solüsyonu her çalışma için yeniden hazırlanarak kullanılmıştır. DMSO oranı total inkübasyon hacminin %0.1'ini geçmemiştir.

2.8 Yöntem

2.8.1 HUVEC hücre kültürü

HUVEC hücreleri Nutrient Mixture F-12 (Ham's F12K), ısı ile inaktive edilmiş %20 FBS, 10 ml/L Penicilin/Streptomycin, 100 mg/L Heparin, 30 mg/L Endothelial Cell Growth Supplement'dan oluşan medyum içerisinde 25 cm²'lik flasklarda, 37°C'de, %5 CO₂ içeren karbondioksit inkübatöründe kültüre edilmiştir.

2.8.2 A549 hücre kültürü

A549 hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum, RPMI-1640 medyum ve Penicilin-Streptomycin ve %7,5 NAHC03 içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.8.3 Hücre sayımları

Görünümleri kaldırım taşıyı andırır biçimde olan HUVEC hücreleri ve epitel yapıda olan A549 hücreleri flaskları %70 oranında doldurduklarında PBS-EDTA (Phosphate Buffer Saline - Ethylenediaminetetraacetic acid) (PBS: 137 μ M NaCl, 2.7 μ M KCl, 15 μ M KH₂PO₄, 8 μ M NaHPO₄, pH 7.3, EDTA: 1M) ile yıkanmışlardır. Daha sonra Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flask yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanmıştır. 2 ml hacimli ependorf tüplere her bir örneğimiz için 0.5 ml %0.4'lük Tripan mavisi solusyonundan eklenmiş ve üzerine iyice pipetlenerek homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 0.5 ml ilave edilerek karıştırılmıştır. 10 dakika beklendikten sonra Trypan mavisi ile boyanmış HUVEC ve A549 hücreleri Thoma lamı ile sayılmıştır. Sayımlar 3 kez tekrarlanmıştır.

2.8.4 Test maddelerinin hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalar

2.8.4.1 Hücre çoğalımı deneyleri (MTT)

MTT yöntemi hücre çoğalmasının ve mitokondrial fonksiyonun bir belirteci olarak kullanılır. MTT testi, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)) mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas kalorimetrik bir testtir.

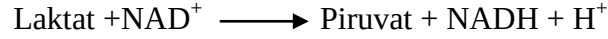
MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondrial dehidrojenazı tetrazolium halkasını böler ve MTT sitotoksite yöntemi hücrenin, tetrazolium tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondrial fonksiyon azalır ve sonuç olarak çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok hücre hattında hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır. Bu teknik özellikle metabolik olarak aktif hücreler için kullanılmaktadır, çoğalmayan ya da süspansiyon hücre kültürlerinde kullanılmaz

(Mosmann, 1983). Aynı pasaj numarasına sahip HUVEC ve A549 hücreleri flaskların %70'ini kapladığında flasklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak hücrelerin tabanından ve birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra hücreler Thoma lamı ile sayılmışlardır. Hücre çoğalımı deneyleri için 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. A549 hücre hattı için her kuyucuğa 5×10^3 hücre, HUVEC hücre hattı için her kuyucuğa 8×10^3 hücre gelecek şekilde 2'şer adet 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve test maddelerinin belirlenen dozları hücrelere eklenmiştir. Deneyler 2 gün boyunca sürdürülmüştür. Hücreler gerekli sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerleri gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerden uzaklaştırılmış ve MTT ilavesi yapılarak test maddelerinin hücre çoğalmasına olan etkileri saptanmıştır. Hücreler 5 mg/ml^{-1} MTT stok solüsyonu ile 2 saat CO_2 inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda MTT içeren besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 100 μl DMSO ilave edilmiştir. 5 dakika beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm. dalga boyunda okutulmuştur (Bézivin ve ark., 2003; Holst ve Oredsson, 2005).

2.8.4.2 LDH (Laktat Dehidrojenaz)

LDH aktivitesi Roche Detection Kit kullanılarak tespit edilmiştir. Deney LDH varlığında NAD'ın azalmasında paralel olarak laktatın pirüvata dönüşümüne dayanır. Kültür medyumundaki LDH miktarı hücre zarındaki zararın miktarı ile ilgili bilgi vermektedir. Hücre zarı zarar gördükçe enzim miktarı da artmaktadır. Bu deneyde ilk önce laktatın pirüvata LDH tarafından katalize edildiği NAD^{+} 'nın NADH/H^{+} reaksiyonu meydana gelir. Daha sonra katalizleyen kimyasal (diaforaz), NADH/H^{+} 'dan H/H^{+} 'i alarak tetrazolium tuzuna 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT)'e aktarır ve indirgeyerek kırmızı formazan oluşmasına neden olur (Butler 2004; Fotakis ve Timbrell 2006; Yurdakök 2010). Sekonder metabolitlerin neden olduğu LDH salınımını belirlemek için kültür medyumunu gereklidir. Maddelerle muamele edilen hücrelerin

üzerindeki medyumlar alınarak 96'lık plakaya konuldu. Her bir kuyucuğa 100 µl reaksiyon karışımı eklendikten sonra 30 dakika inkübasyona bırakıldı daha sonra 50 µl durdurucu solüsyon eklendi ve 10 saniye kadar horizontal karıştırıcıda karıştırıldı. Eliza cihazı kullanılarak 490 nm'de örnekler okutuldu. LDH enziminin katalizlediği reaksiyon aşağıda gösterilmiştir (Tan 2008).



2.8.4.3 ROS (Reaktif Oksijen Türleri)

ROS ölçümü, ROS (Reaktif Oksijen Türleri) aktivitesini ölçmeye yarayan bir yöntemdir. ROS ölçümü Stiktik asit, Salazinik Asit ve Atranorin varlığında ve yokluğunda yapılmıştır. Hücreler 96'lık kültür plakalarına ekilmiş, 24 saat sonra plakalardaki medyum dökülmüş ve hücreler 2-3 defa DPBS veya HBSS ile yıkanmıştır. Tekrar plaka ters çevrilerek plakalardaki sıvı boşaltılmıştır. Daha sonra hücreye geçebilme özelliği olan 100 µL 1X DCFH-DA medyum ile beraber hücreler üzerine verilmiştir. 37°C'de 30-60 dakika inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Tekrar hücreler 2-3 defa DPBS veya HBSS ile yıkanmıştır. DCFH-DA ile yüklü olan hücrelere, Stiktik Asit, Salazinik asit ve Atranorin 100 µL medyumla beraber muamele edilerek plakalar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra plakalar 480nm/530nm arasında floresans plaka okuyucusu tarafından okunmuştur.

2.8.4.4 Tüp oluşumu deneyi

96 kuyucuklu plakalar 70 µl/kuyucuk olacak şekilde matrijel ile kaplanmıştır. Plakalar 37 °C'de 20 dakika bekletilmiştir. Yaklaşık 5 saat % 2 serum (FBS) içeren EBM-2 (Endothelial Cell Basement Medium) içinde serum açlığına maruz bırakılan HUVEC hücreleri 40x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde % 2 oranında serum ve test maddelerinin belirlenen konsantrasyonlarını içeren EBM-2 medyum içinde matrijellerin üzerine ekilmiş ve yaklaşık 12 saat kültüre edilmiştir. Tüp ağı oluşumları mikroskop altında rastgele seçilmiş 5 alandan fotoğraflanmıştır.

2.8.4.5 Koloni oluşumu deneyi

Yumuşak agar koloni formasyonu deneyinde steril edilmiş %3'lük select agar kullanılmıştır. Alt agar tabakası 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğu için 1 ml olarak hesaplanmıştır. 1 kısım agar + 4 kısım besiyeri olacak şekilde hazırlanarak hemen kuyucuklara ilave edilmiştir. Bu sırada 1 ml'lik üst agar tabakası ve 1 ml üst tabaka için 1000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Üst agar tabakası 1 kısım hücre süspansiyonu (hücre miktarı, tüm üst tabaka hacmi için hesaplanacak) + 2 kısım agarlı besiyeri (alt agar tabakası: 1 kısım agar + 4 kısım besiyeri) olarak hazırlanmış ve soğutulmuş olan plakalara ilave edilmiştir.

İlave edilen agar ve besiyeri karışımı donduktan sonra üzerine bir kuyucuk hacmi 2 ml olacak şekilde hesaplanarak 0,1 ml içinde test maddelerinin konsantrasyonları uygulanmıştır ve hücreler 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her gün takip edilerek koloniler 35–40 hücreye ulaşınca (her hücre için bu süre farklıdır, yaklaşık 10-16 gün) inverted mikroskopta sayılmıştır. Sayımlar üç kez tekrar edilmiştir.

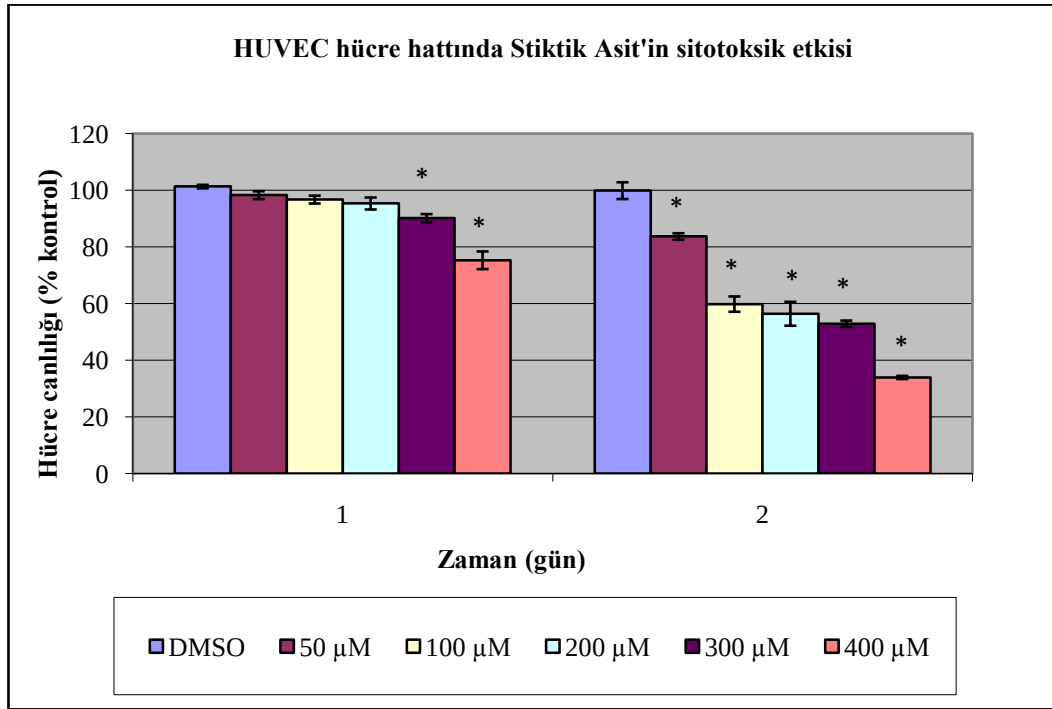
2.9 İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3 BULGULAR

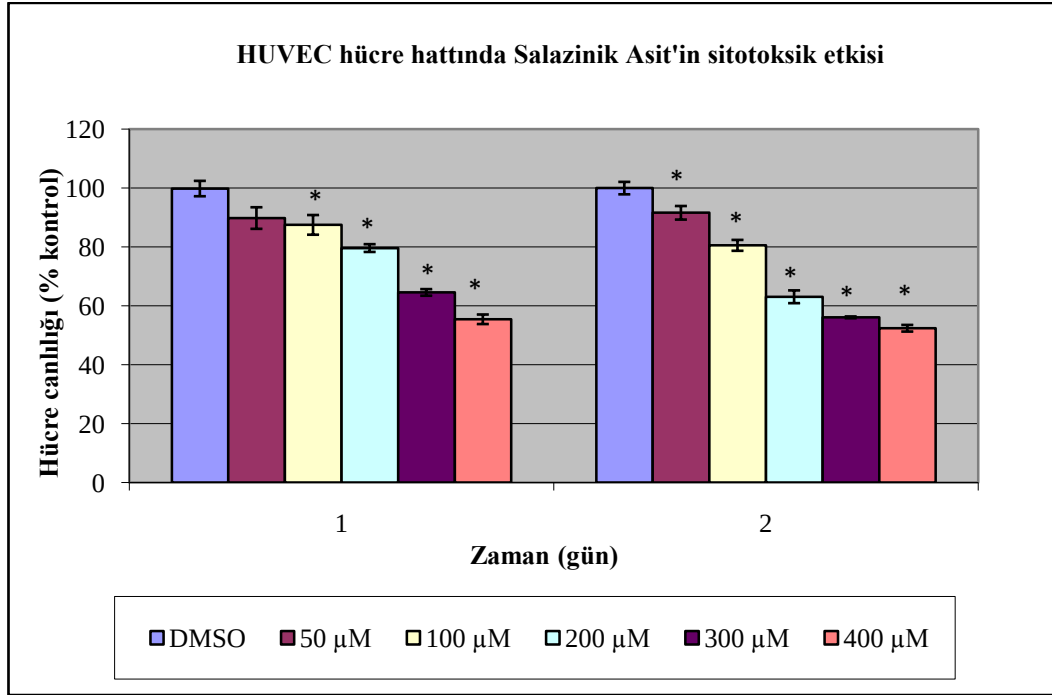
3.1 HUVEC hücreleriyle yapılan deneyler

3.1.1 Stiktik Asit, Salazininik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının MTT deney sonuçları



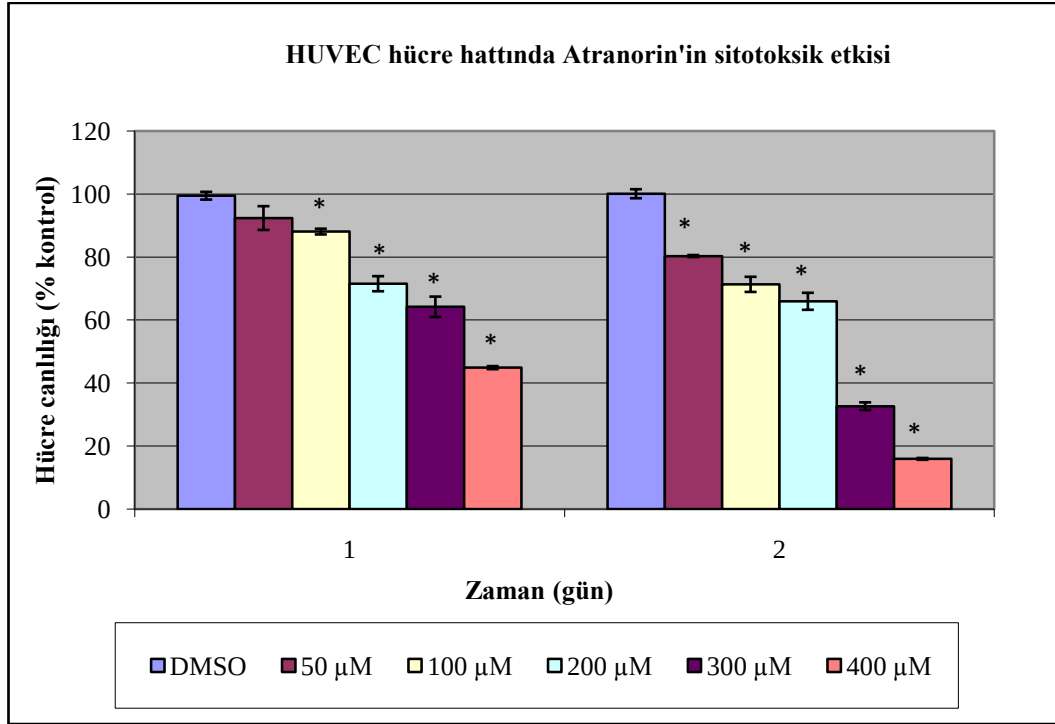
Şekil 3. 1. Stiktik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

HUVEC hücre hattında Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları denenmiştir. 50 µM dozunda 24 saat sonunda %93, 48 saat sonunda ise %83 oranında hücre aktivitesi gözlenmiştir. 100 µM'lık dozda birinci günün sonunda %4, ikinci günün sonunda ise %41 oranında hücre sayısında azalma tespit edilmiştir. 200 µM dozunda 24 saatte %95, 48 saat sonunda %56 hücre canlılığı belirlenmiştir. 300 µM'lık dozda ilk gün sonunda %10, ikinci gün sonunda ise % 48 oranında hücrelerin canlılık aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. 400 µM dozunda hücre aktivitesi 24 saat sonunda %75, 48 saat sonunda ise %33 olduğu tespit edilmiştir.



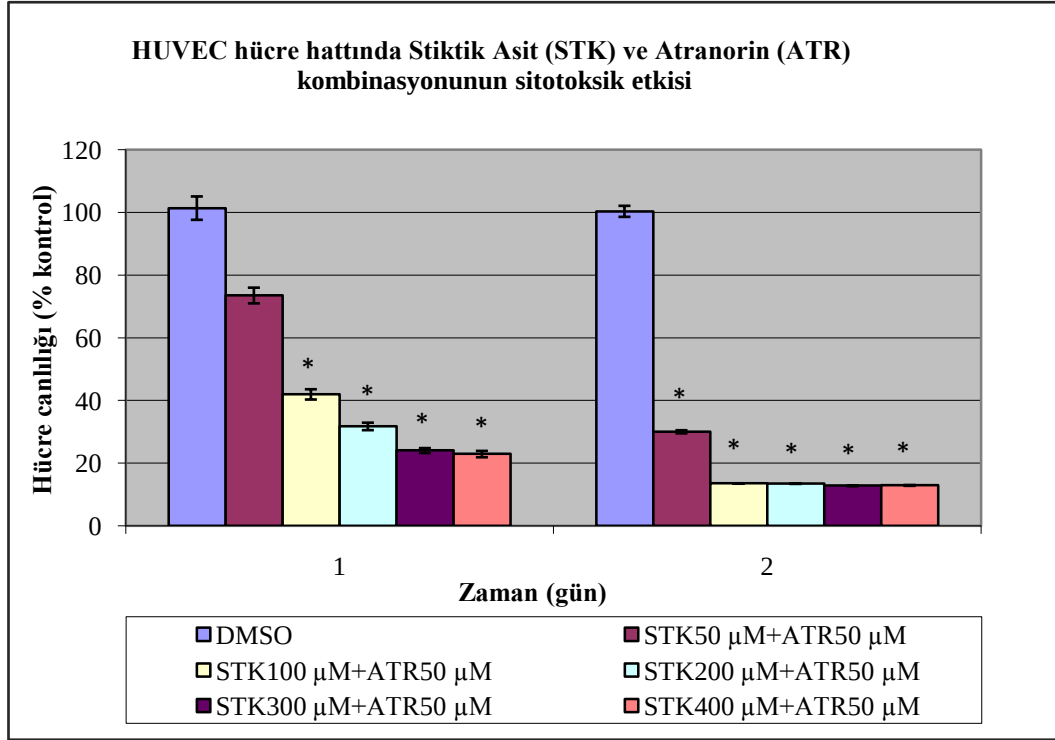
Şekil 3.2.Salazininik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi
(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

HUVEC hücre hattında Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları denenmiştir. 50 µM dozunda 24 saatte %89, 48 saat sonunda %91 hücre canlılığı belirlenmiştir. 100 µM'lık dozda birinci günün sonunda %13, ikinci günün sonunda ise %20 oranında hücre sayısında azalma tespit edilmiştir. 200 µM dozunda 24 saat sonunda %79, 48 saat sonunda ise %63 oranında hücre aktivitesi tespit edilmiştir. 300 µM'lık dozda ilk gün sonunda %36, ikinci gün sonunda ise % 44 oranında hücrelerin canlılık aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. 400 µM dozunda hücre aktivitesi 24 saat sonunda %55, 48 saat sonunda ise %52 olduğu tespit edilmiştir.



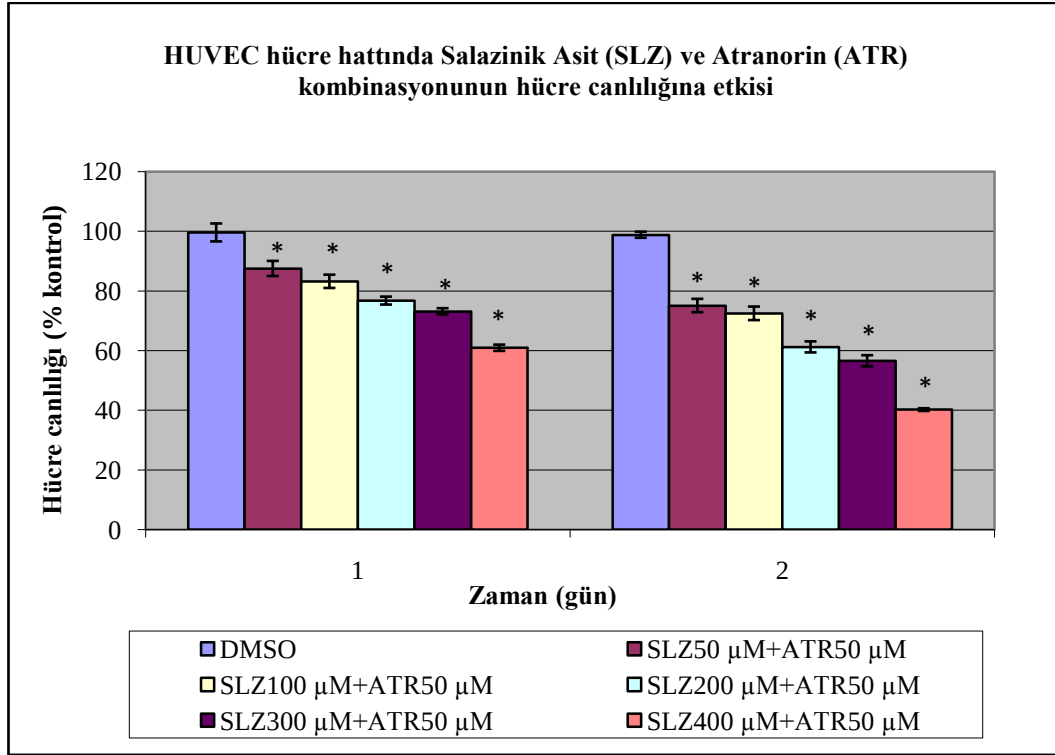
Şekil 3. 3.Atranorin'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

HUVEC hücre hattında Atranorin'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μM 'lık dozları denenmiştir. 50 μM dozunda birinci günün sonunda %8, ikinci günün sonunda ise %20 oranında hücre sayısında azalma tespit edilmiştir 100 μM 'lık dozda 24 saat sonunda %88, 48 saat sonunda ise %71 oranında hücre aktivitesi ölçülmüştür. 200 μM dozunda 24 saat sonunda %71, 48 saat sonunda ise %65 oranında hücre aktivitesi tespit edilmiştir. 300 μM 'lık dozda ilk gün sonunda %36, ikinci gün sonunda ise % 68 oranında hücrelerin canlılık aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. 400 μM dozunda hücre aktivitesi 24 saat sonunda %44, 48 saat sonunda ise %15 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. 4. Stiktik Asit'in bütün dozları ile Atranorin'in 50 μ M doz kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

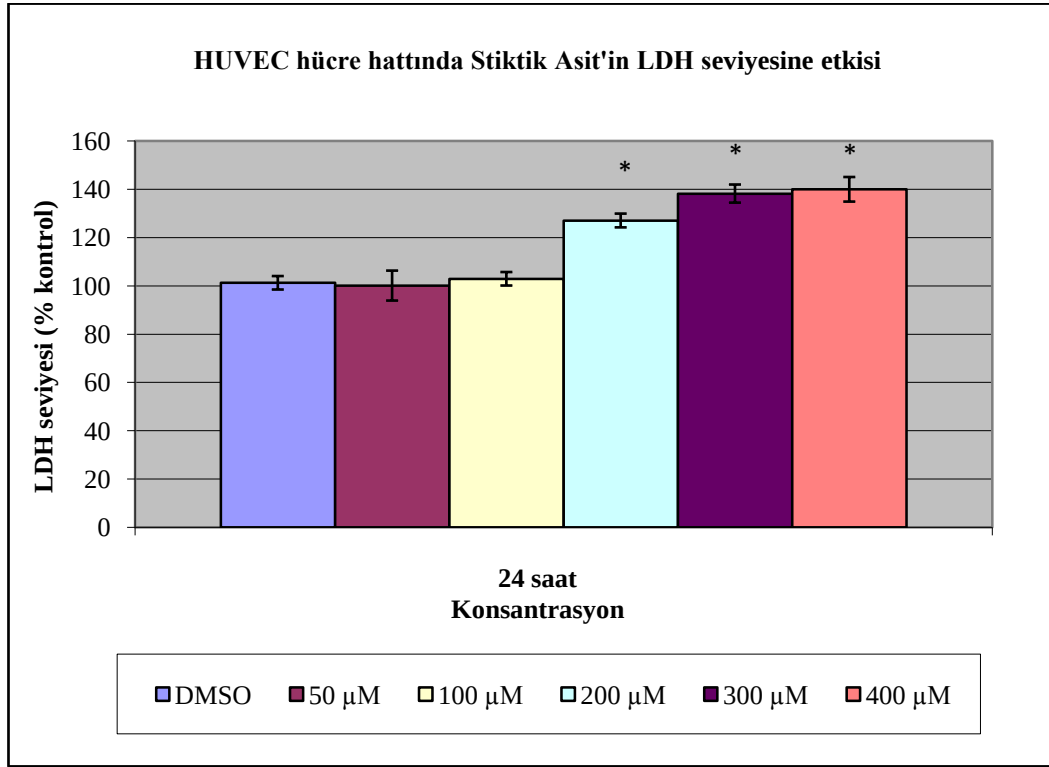
HUVEC hücre hattında Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μ M'lık dozları ile Atranorin'in 50 μ M'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. STK50+A50 μ M kombinasyonunda 1.gün sonunda %73'lük, 2.gün sonunda ise %30'luk hücre canlılığı belirlenmiştir. STK100+A50 μ M dozunda 1.gün sonunda %59 oranında, 2.gün sonunda %87 oranında hücre sayısında azalma tespit edilmiştir. STK200+A50 μ M kombinasyonunda 1.günde %31 oranında, 2.günde ise %13 oranında hücre aktivitesi ölçülmüştür. STK300+A50 μ M dozunda 1.gün sonunda hücre çoğalmasındaki düşüş %76 iken, 2.gün sonunda %88 olmuştur. STK400+A50 μ M dozunda 1.gün %22 oranında, 2.gün %12 oranında hücre canlılığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. 5.Salazininik Asit'in bütün dozları ile Atranorin'in 50 µM doz kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

HUVEC hücre hattında Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları ile Atranorin'in 50 µM'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. SLZ50+A50 µM kombinasyonunda 1.gün sonunda %87, 2.gün sonunda %75 hücre aktivitesi ölçülmüştür. SLZ100+A50 µM dozunda 1.gün %17, 2.gün %28 oranında hücre canlılığında düşüş meydana gelmiştir. SLZ200+A50 µM'da 1.günde %76, 2.günde %61 oranında hücre aktivitesi ölçülmüştür. SLZ300+A50 µM kombinasyonunda 1.gün sonunda hücre çoğalmasındaki düşüş %27 iken, 2.gün sonunda %44 oranında belirlenmiştir. SLZ400+A50 µM dozunda 1.gün hücre oranı %60 iken, 2.gün sonunda %40'a düşmüştür.

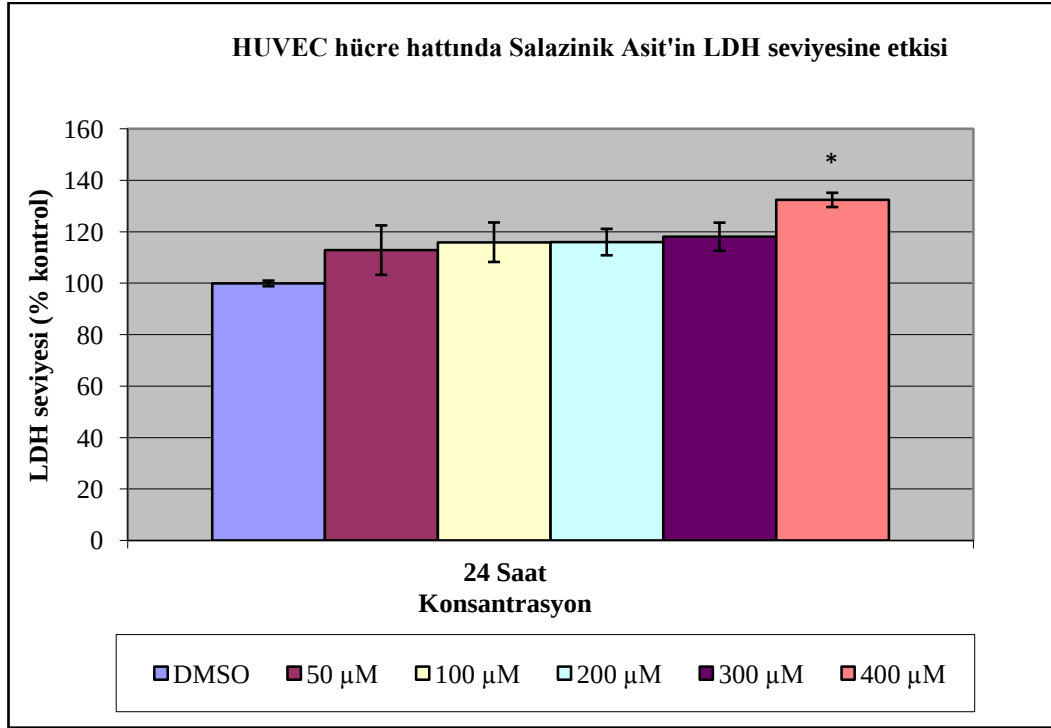
3.1.2 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının LDH deney sonuçları



Şekil 3.6. Stiktik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.

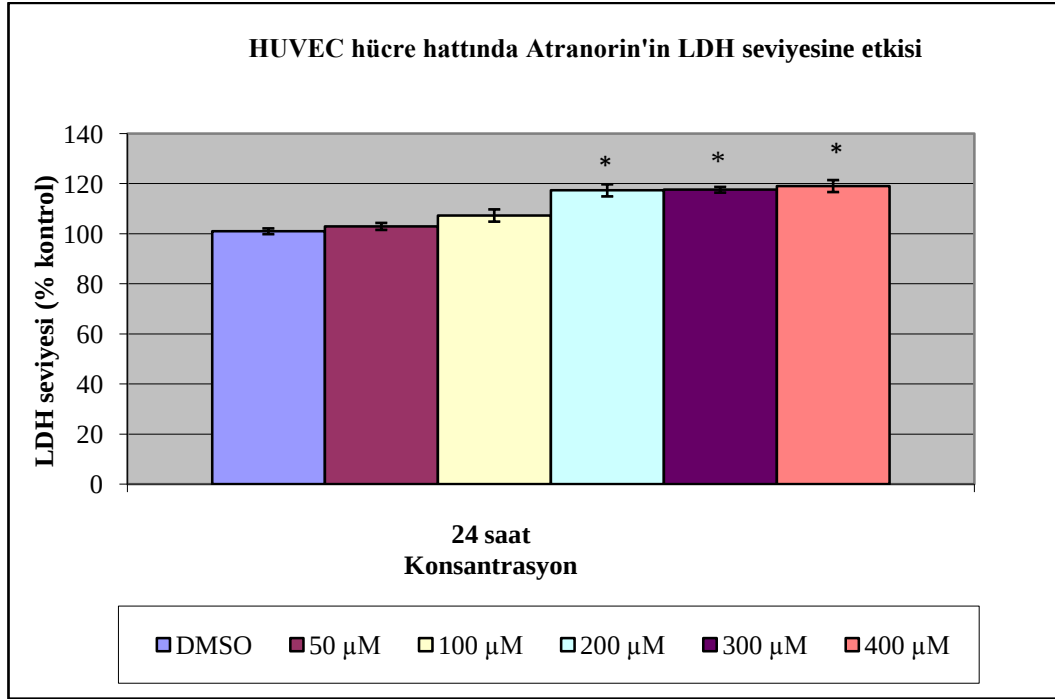
(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

MTT deney sonuçları göz önüne alındığında Stiktik asit ile muamele elden HUVEC hücrelerinde yapılan LDH ölçümünde LDH aktivitesinde artış beklenmektedir. Şekil 6'da görüldüğü gibi 50, 100, 200, 300 ve 400 µM dozlarında LDH seviyesinde artış gözlenmiştir. Stiktik Asit hücrelere verildikten 24 saat sonra yapılan ölçümlerde 50 µM dozunda LDH seviyesi kontrol grubuyla aynı orandadır. Stiktik asitin 100 µM dozunda LDH seviyesindeki artış %2, 200 µM dozunda ise %27 olarak belirlenmiştir. 300 µM dozunda LDH seviyesi ölçümü %38 olarak belirlenmiştir. 400 µM dozunda LDH salınımını %39 oranında arttığı tespit edilmiştir.



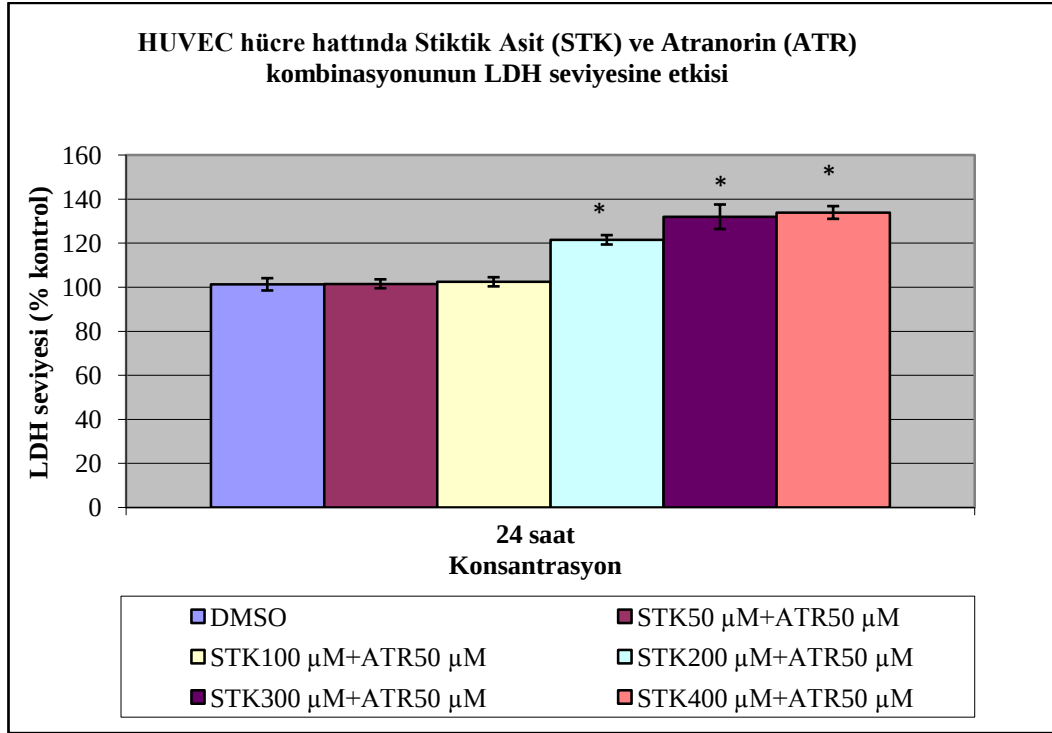
Şekil 3.7. Salazininik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozlarının HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi LDH testi ile değerlendirilmiştir. Yapılan testlere göre sadece 400 µM'lık dozda anlamlı artışlar gözlenmiştir. Salazininik Asit hücrelere verildikten 24 saat sonra yapılan ölçümlerde 50 µM dozunda LDH seviyesinde %12 oranında artış gözlenmiştir. 100 µM dozunda LDH seviyesi % 15 olarak belirlenmiştir. 200 µM dozunda ise LDH salınımı %15 ölçülmüştür. 300 µM dozunda LDH ölçümü %18 olarak belirlenmiştir. 400 µM dozunda LDH salınımı %32 olarak tespit edilmiştir.



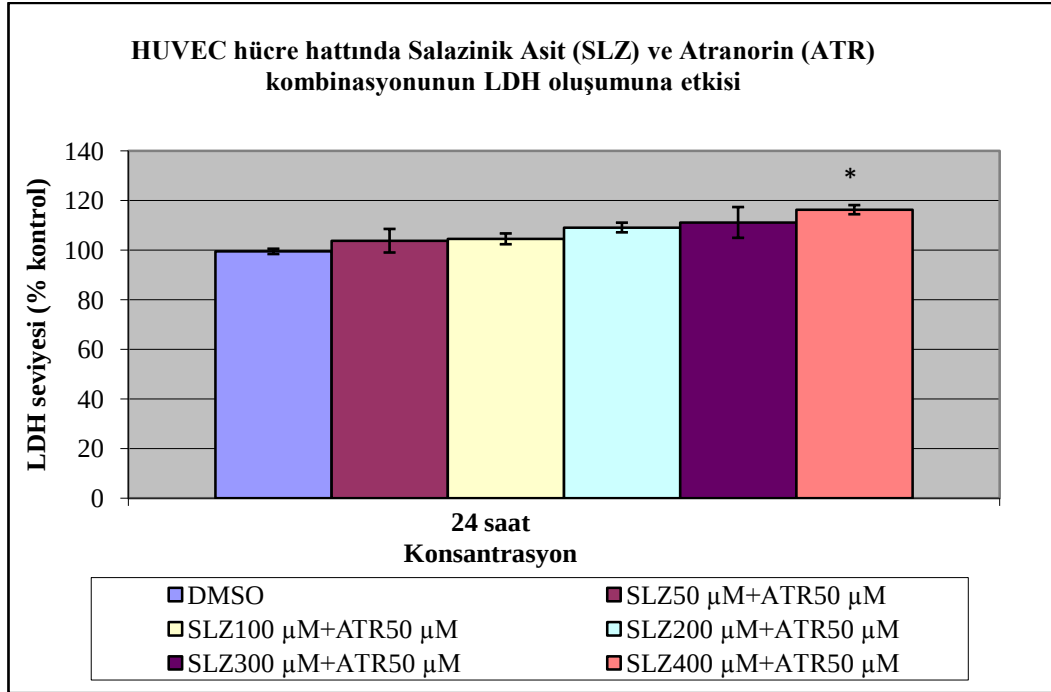
Şekil 3. 7.Atranorin`in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi
(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Atranorin ile muamele elden HUVEC hücrelerinde yapılan LDH ölçümünde LDH aktivitesinde artış beklenmektedir. Grafikte görüldüğü üzere 50, 100, 200, 300 ve 400 µM dozlarında LDH seviyesinde artış gözlenmiştir. Atranorin hücrelere verildikten 24 saat sonra yapılan ölçümlerde 50 µM dozunda LDH seviyesinde %2 oranında bir artış gözlenmiştir. 100 µM dozunda LDH seviyesindeki artış %7, 200 µM dozunda ise %17 olarak belirlenmiştir. 300 µM dozunda LDH seviyesi ölçümü %17 olarak belirlenmiştir. 400 µM dozunda LDH salınımını %19 oranında arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. 8.Stiktik Asit'in tüm dozları ile Atranorin'in 50 μ M doz kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

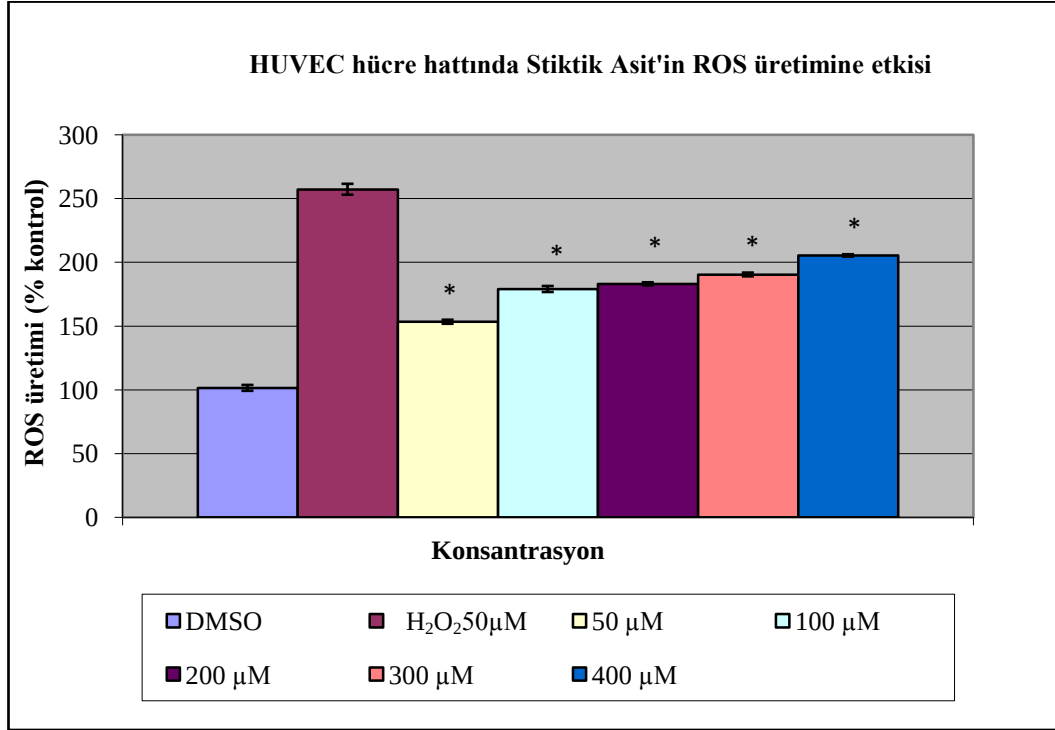
Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μ M'lık dozları ile Atranorin'in 50 μ M dozu kombinlenerek HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi LDH testi ile değerlendirilmiştir. STK50+ATR50 μ M dozunda LDH seviyesi kontrol grubuyla aynı değerde çıkmıştır. STK100+ATR50 μ M dozunda LDH seviyesi %2 oranında artış göstermiştir. STK200+ATR50 μ M dozunda ise LDH salınımı %121 ölçülmüştür. STK300+ATR50 μ M dozunda LDH seviyesindeki artış %31 olarak belirlenmiştir. STK400+ATR50 μ M dozunda LDH salınımı %133 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3. 9. Salazininik Asit'in tüm dozları ile Atranorin'in 50 µM doz kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

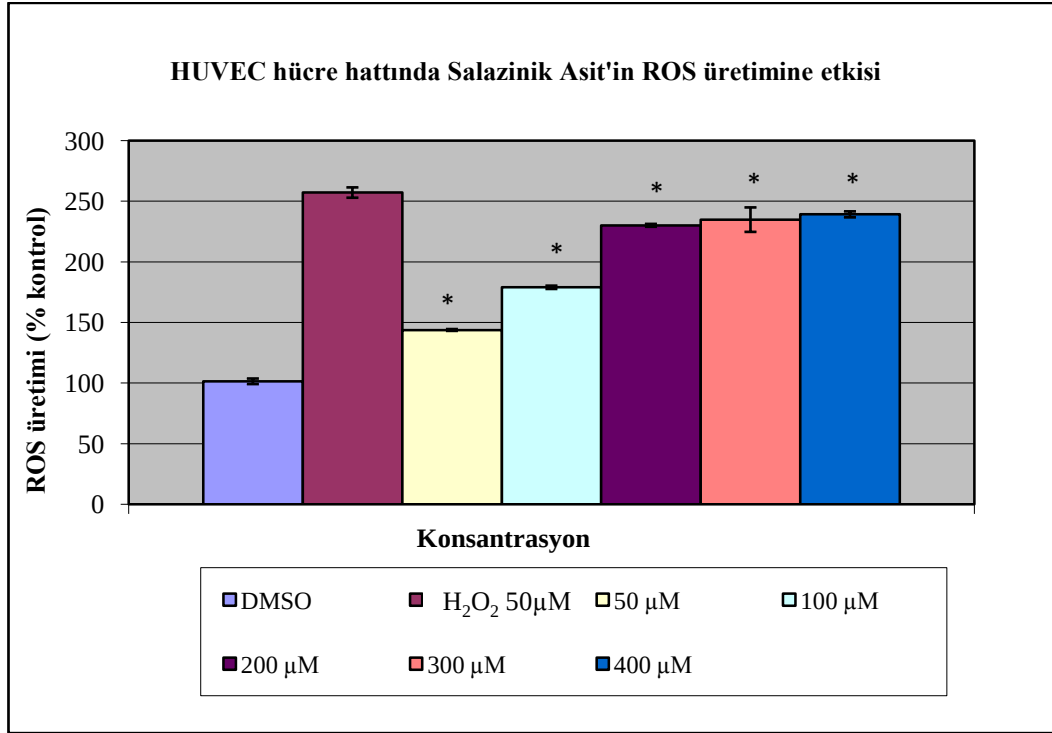
Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları ile Atranorin'in 50 µM dozu kombinlenerek HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi LDH testi ile değerlendirilmiştir. SLZ50+ATR50 µM dozunda LDH seviyesi %3 artış göstermiştir. SLZ100+ATR50 µM dozunda LDH seviyesi %4 oranında artış göstermiştir. SLZ200+ATR50µM dozunda ise LDH salınımı %109 ölçülmüştür. SLZ300+ATR50µM dozunda LDH seviyesindeki artış %11 olarak belirlenmiştir. SLZ400+ATR50µM dozunda LDH salınımı %116 olarak tespit edilmiştir.

3.1.3 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının ROS üretimine etkileri



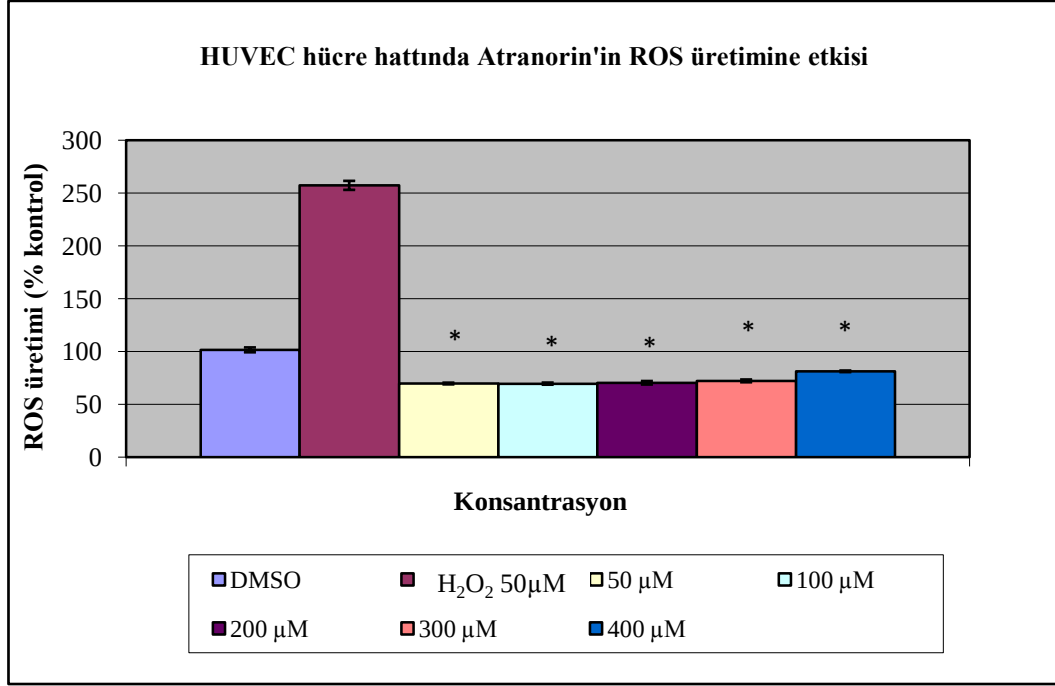
Şekil 3. 10. Stiktik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi. Kullanılan H₂O₂ 50 μM dozundadır. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p < 0,05

Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μM'lık dozlarının HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi ROS testi ile değerlendirilmiştir. H₂O₂ oranı 50 μM olarak ayarlanmıştır. Stiktik Asit'in en yüksek dozunun bile H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stres oranını geçmemesi beklediğimiz sonuçlar arasındadır. Stiktik Asit'in dozları değerlendirildiğinde bütün dozların ROS oluşturduğu gözlenmiştir. 50 μM dozunun %153, 100 μM dozunun %178 oranında oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. 200 μM dozu %183 seviyesinde ROS oluşturmuştur. 300 μM dozu %190 oranında, 400 μM dozu ise %205 oranında oksidatif stres oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 3. 11.Salazininik Asit'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi. Kullanılan H₂O₂ 50 µM dozundadır. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

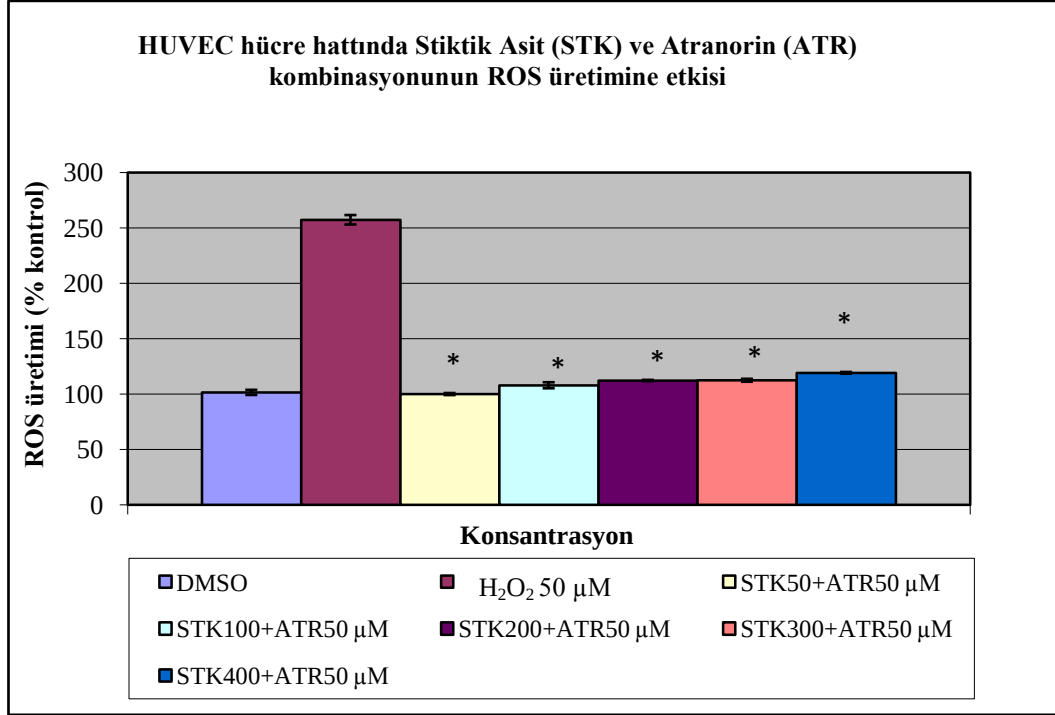
Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozlarının HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi ROS testi ile değerlendirilmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Salazininik Asit'in bütün dozlarında anlamlı sonuçlar gözlenmiştir. 50 µM dozunun %143 oranında, 100 µM dozunun %178 µM oranında oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. 200 µM dozunda %230 oranında, 300 µM dozunda ise %234 oranında ROS ölçümü yapılmıştır. 400 µM'lık dozun ise en etkili doz olduğu belirlenmiştir, %239 oranında ROS oluşturmuştur.



Şekil 3.12. Atranorin'in HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi.

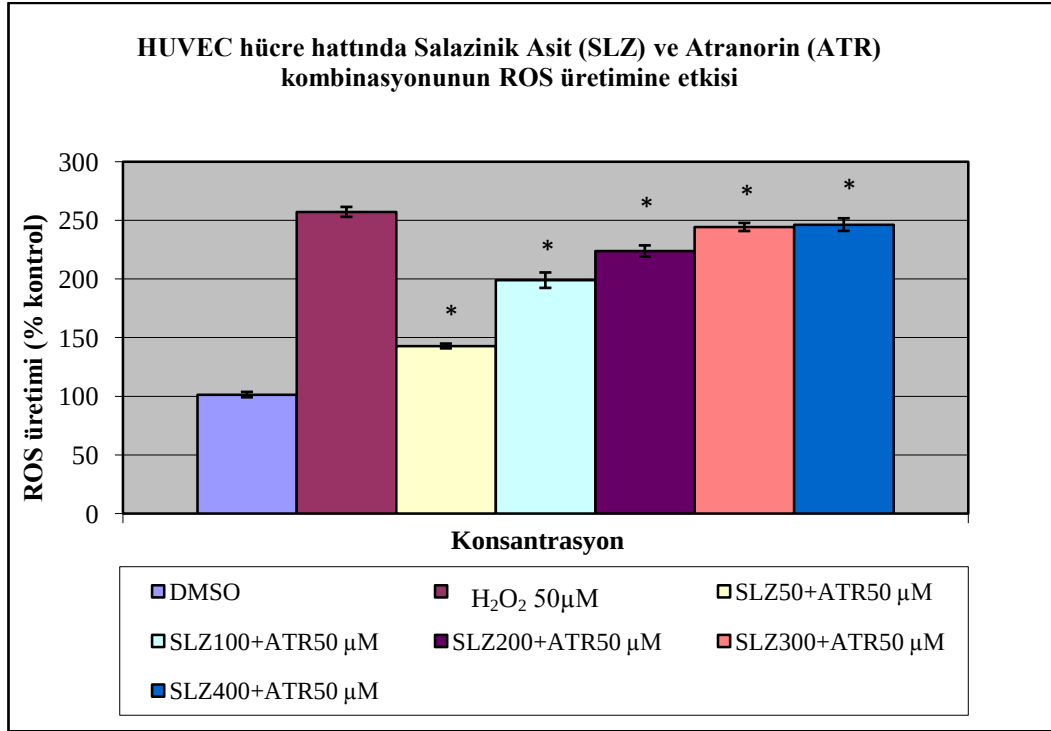
Kullanılan H₂O₂ 50 µM dozundadır. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p<0,05

Atranorin'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozlarının HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi ROS testi ile değerlendirilmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Atranorin'in en yüksek dozunun bile H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stres oranını geçmemesi beklediğimiz sonuçlar arasındadır. 50 ve 100 µM dozlarının %69 oranında ROS oluşturduğu belirlenmiştir. 200 µM dozunun %70 oranında, 300 µM dozunun %72 oranında ve 400 µM dozunun ise %81 oranında oksidatif stres oluşturduğu gözlenmiştir. Atranorin'in bütün dozlarının kontrol grubundan düşük seviyede ROS oluşturması bu maddenin oksidatif stres üzerinde koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 13.Stiktik Asit'in tüm dozları ile Atranorin 'in 50 µM doz kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi. Kullanılan H₂O₂ 50 µM dozundadır. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p < 0,05

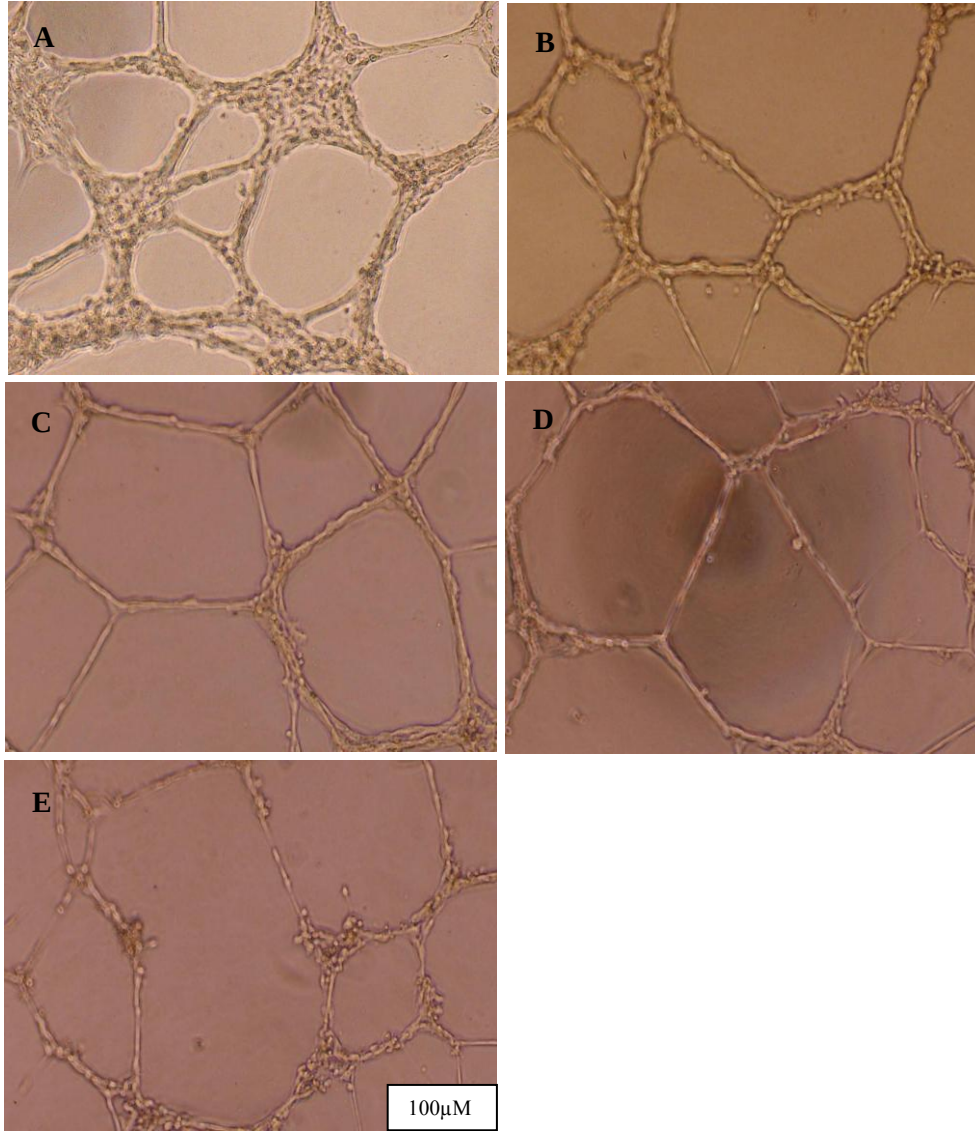
HUVEC hücre hattında Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları ile Atranorin'in 50 µM'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Stiktik Asit ve Atranorin'in en yüksek dozunun bile H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stres oranını geçmemesi beklediğimiz sonuçlar arasındadır. STK50+A50 µM dozunda %99 oranında, STK100+A50 µM dozunda ise %107 ROS aktivitesi belirlenmiştir. STK200+A50 µM ve STK300+A50 µM dozunun %112 oranında, STK400+A50 µMdozunun ise % 119 oranında oksidatif stres oluşturduğu ölçülen sonuçlardandır. Stiktik Asit'in en yüksek dozunda %205 oranında, Atranorin'de ise %81 oranında ROS aktivitesi ölçülmüştür. Bu iki maddenin kombinasyonundan daha yüksek düzeyde bir ROS aktivitesi beklenirken STK400+ATR50 µM kombinasyonunda %119 oranında aktivite belirlenmiştir. Dozların H₂O₂'den daha düşük oksidatif strese sebep olması Atranorin'in koruyucu özelliği olabileceğinin göstergesidir.



Şekil 3. 14. Salazininik Asit'in tüm dozları ile Atranorin 'in 50 µM doz kombinasyonunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ROS ölçümü ile değerlendirilmesi. Kullanılan H₂O₂ 50µM dozundadır. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

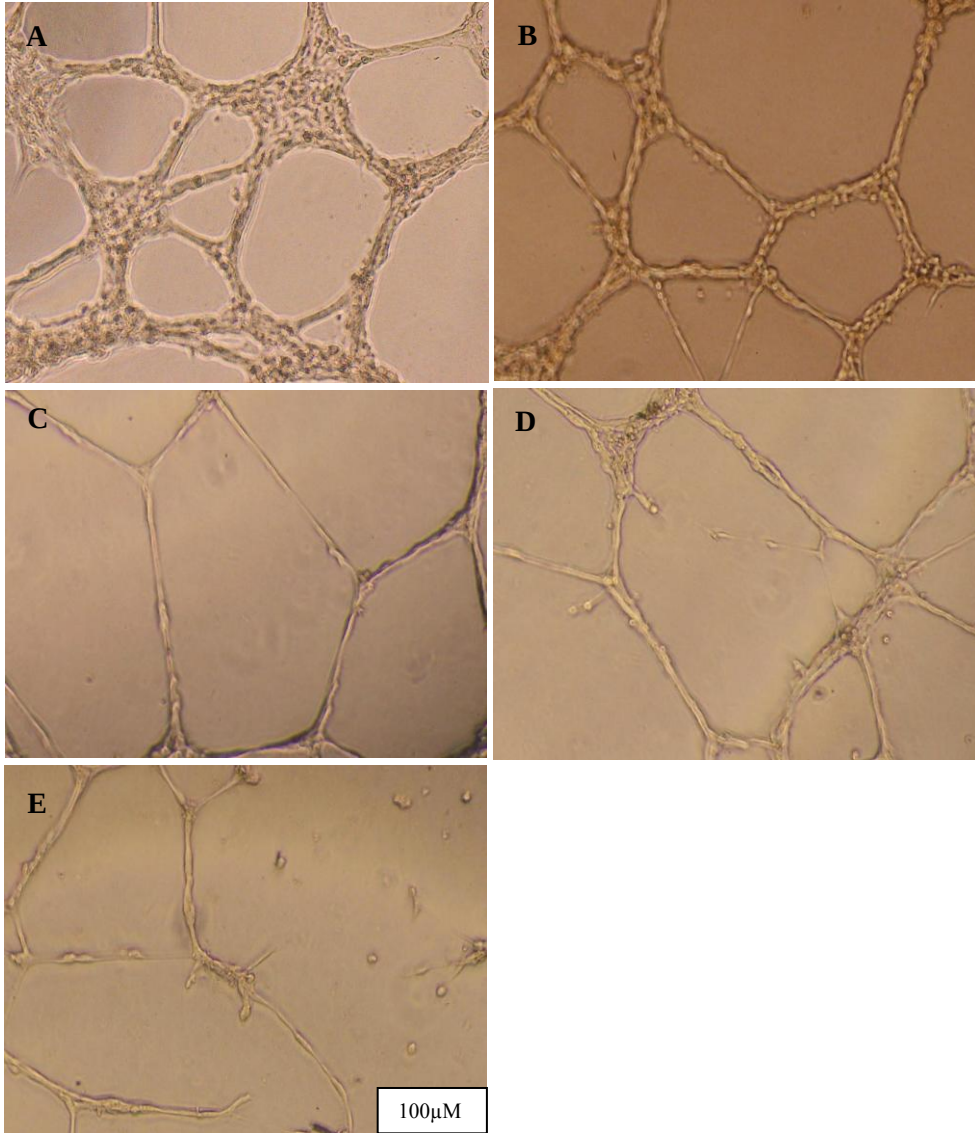
HUVEC hücre hattında Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları ile Atranorin'in 50 µM'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Salazininik Asit ve Atranorin'in en yüksek dozunun bile H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stres oranını geçmemesi beklediğimiz sonuçlar arasındadır. SLZ50+A50 µM dozunda %142 oranında, SLZ100+A50µM dozunda ise %198 ROS aktivitesi belirlenmiştir. SLZ200+A50µM dozunda %223, SLZ300+A50µM dozunun %244 oranında, SLZ400+A50µM dozunun ise %246 oranında oksidatif stres oluşturduğu ölçülen sonuçlardandır. Salazininik Asit'in en yüksek dozunda %239 oranında, Atranorin'de ise %81 oranında ROS aktivitesi ölçülmüştür. Bu iki maddenin kombinasyonundan daha yüksek düzeyde bir ROS aktivitesi beklenirken SLZ400 ve ATR50 µM kombinasyonunda %246 oranında aktivite belirlenmiştir

3.1.4 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının tüp oluşumuna etkileri



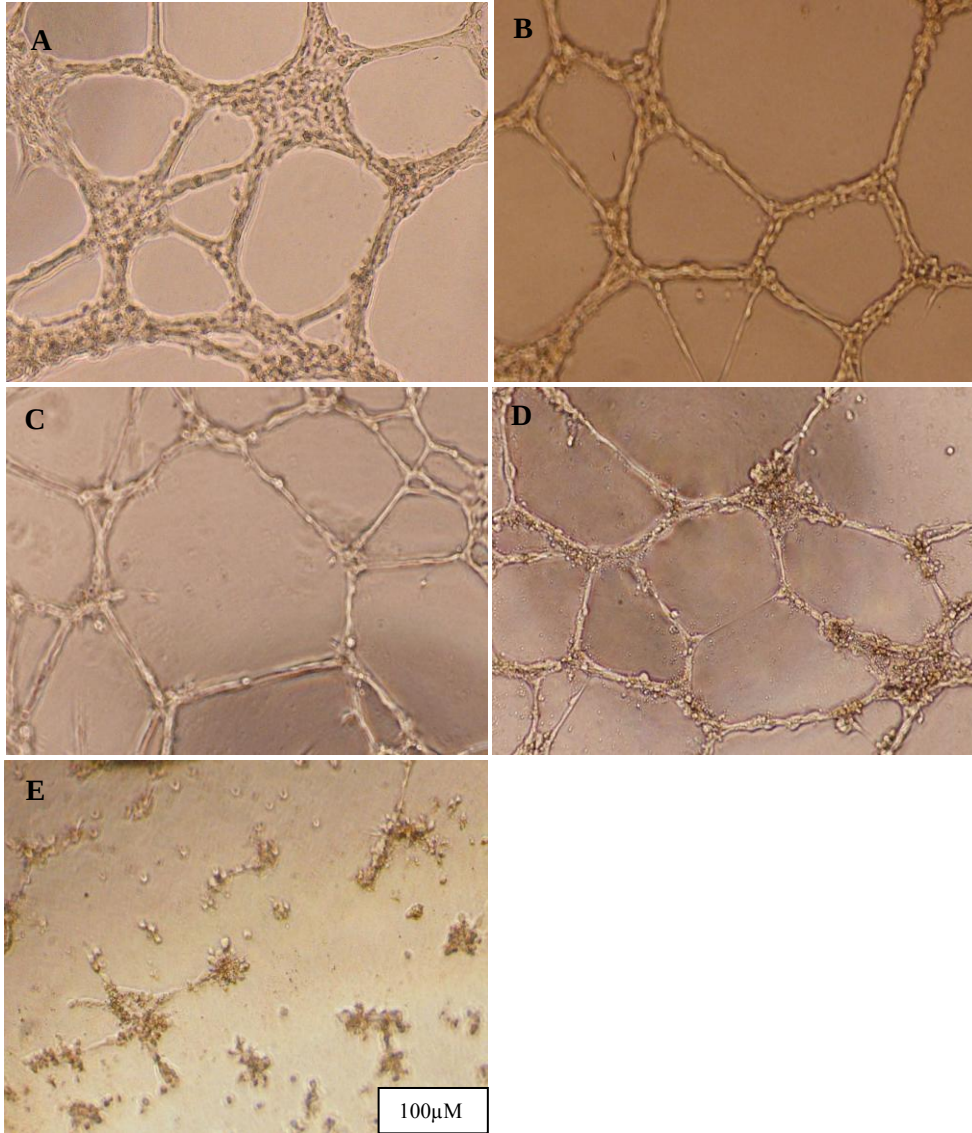
Şekil 3. 15.Stiktik Asit'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine etkilerinin görüntüleri A) kontrol B) DMSO C) 100μM D) 200 μM E) 400 μM. Ölçü birimi 100μM

Stiktik Asit'in 100, 200 ve 400 μM dozları ile muamele edilen HUVEC hücre hattında verilen bileşiklerin tüp oluşumunu engellediği belirlenmiştir. 100 μM dozunda oluşan tüplerin çok ince ve lümenlerin çok geniş olduğu belirlenmiştir. 200 μM dozunda ise lümen genişlikleri artmış, oluşan tüpler daha da incelmıştır. 400 μM dozunda ise Stiktik Asit'in tüp oluşumunu engellediği gözlenmiştir.



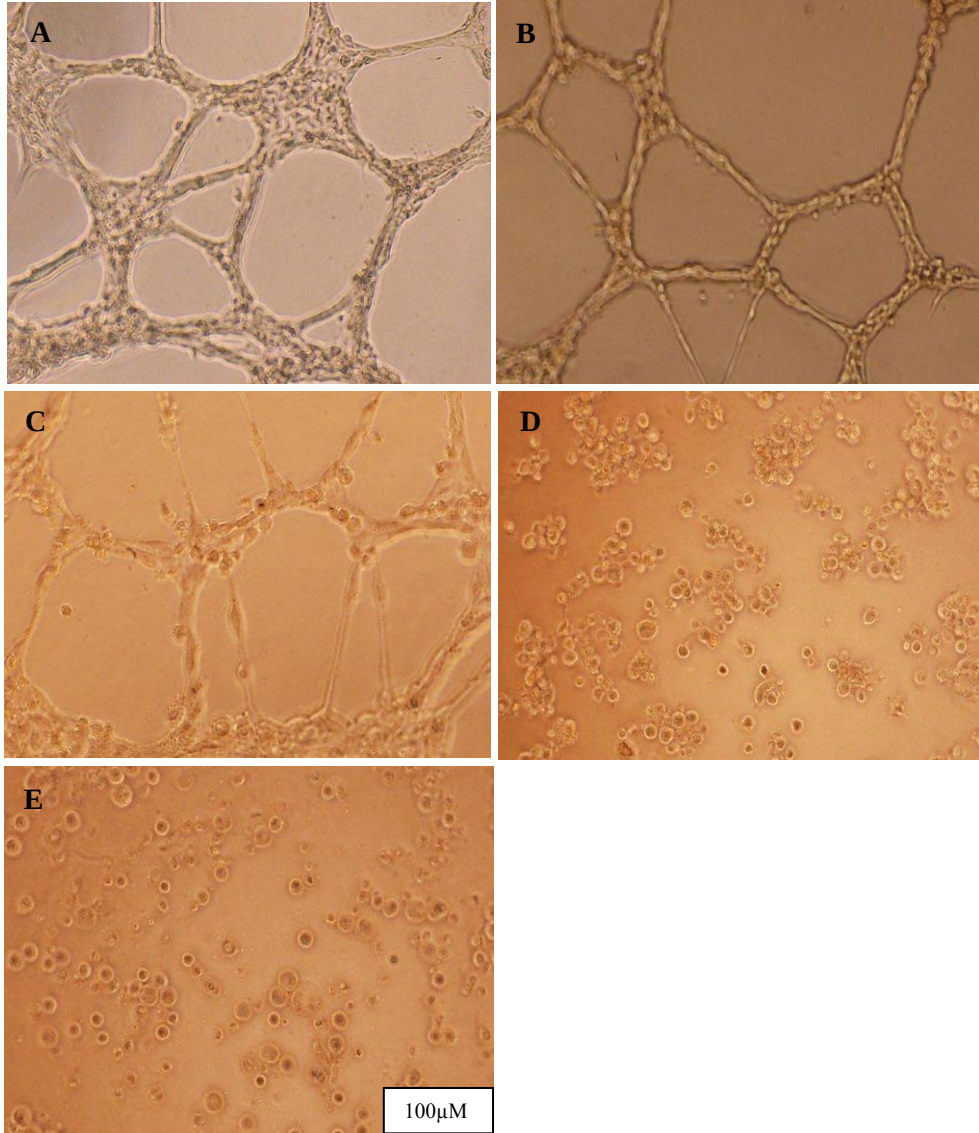
Şekil 3. 16. Salazinik Asit'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma üzerine etkilerinin görüntüleri
A) kontrol B) DMSO C) 100 μ M D) 200 μ M E) 400 μ M Ölçü birimi 100 μ M

Salazinik Asit'in 100, 200 ve 400 μ M'lık dozları ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu incelenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 μ M dozunda lümenlerde genişlemeler ve oluşan tüplerde incelmeler olduğu belirlenmiştir. 200 μ M dozunda lümen genişlikleri daha da artmış ve tüp oluşumunun engellenmeye başladığı gözlenmiştir. 400 μ M dozunda ise lümenlerin çok geniş olduğu ve tüp oluşumunun madde tarafından engellendiği belirlenmiştir.



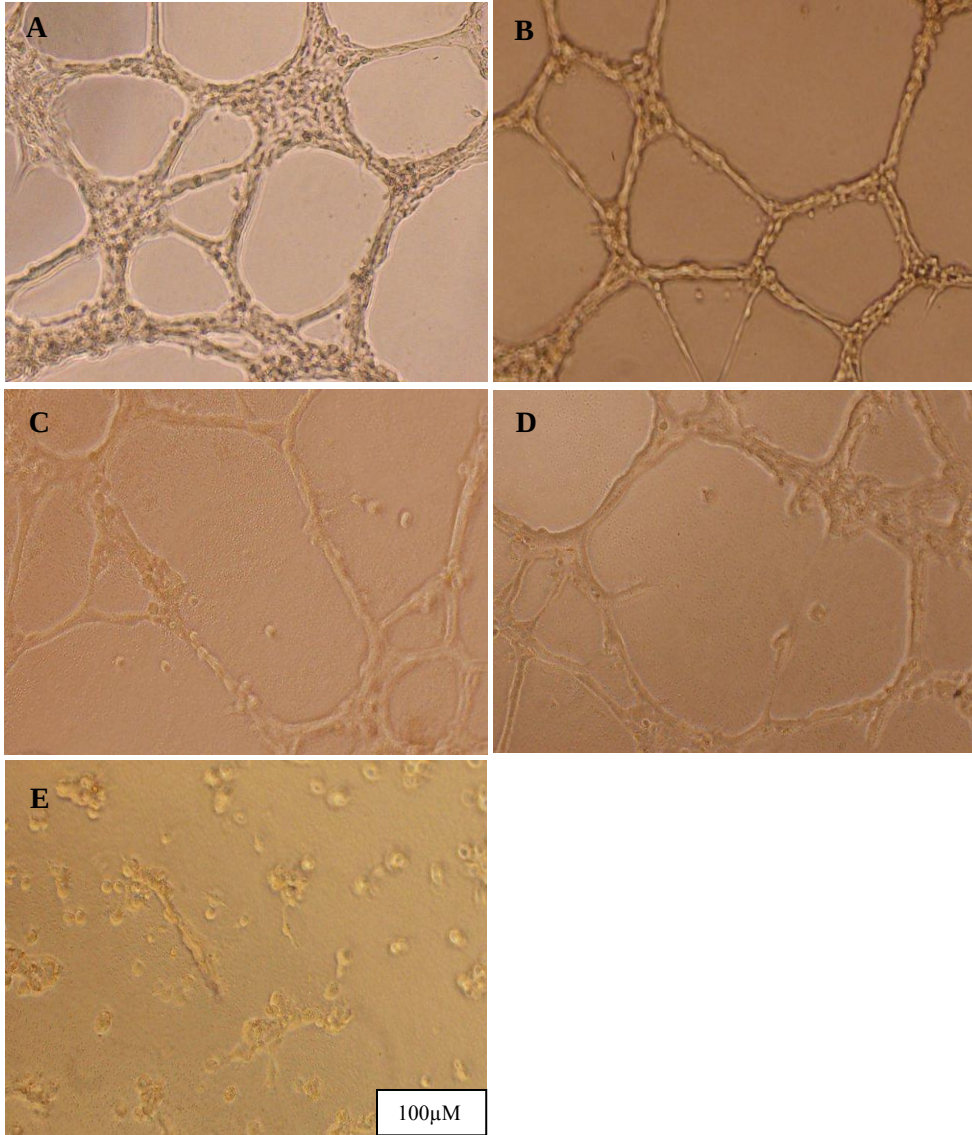
Şekil 3. 17.Atranorin'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşturmaya üzerine etkilerinin görüntüleri A) kontrol B) DMSO C) 100 μ M D) 200 μ M E) 400 μ M Ölçü birimi 100 μ M

Atranorin'in 100, 200 ve 400 μ M'lık dozları ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu incelenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 μ M dozunda lümenlerde genişlemeler ve oluşan tüplerde incelmeler olduğu belirlenmiştir. 200 μ M dozunda lümenlerde genişlemeler olduğu ve tüplerin incelendiği gözlenmiştir. 400 μ M dozunda ise Atranorin'in tüp oluşumunu tamamen engellediği belirlenmiştir.



Şekil 3. 18.Stiktik Asit+Atranorin 50 μM dozunun HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma üzerine etkilerinin görüntüleri A) kontrol B) DMSO C) STK100 μM +ATR50 μM D) STK200 μM +ATR50 μM E) STK400 μM +ATR50 μM Ölçü birimi 100 μM

Stiktik Asit'in 100, 200 ve 400 μM 'lık dozları ile Atranorin'in 50 μM dozunun kombinasyonu ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu incelenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 μM dozunda lümenlerde genişlemeler ve oluşan tüplerde incelmeler olduğu belirlenmiştir. 200 μM ve 400 μM dozlarının tüp oluşumunu tamamen engellediği gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak da Stiktik Asit ve Atranorin kombinasyonunun, maddelerin tek başına gösterdiklerinden daha yüksek oranda tüp oluşumunu engelleyici etki gösterdiği söylenebilir.

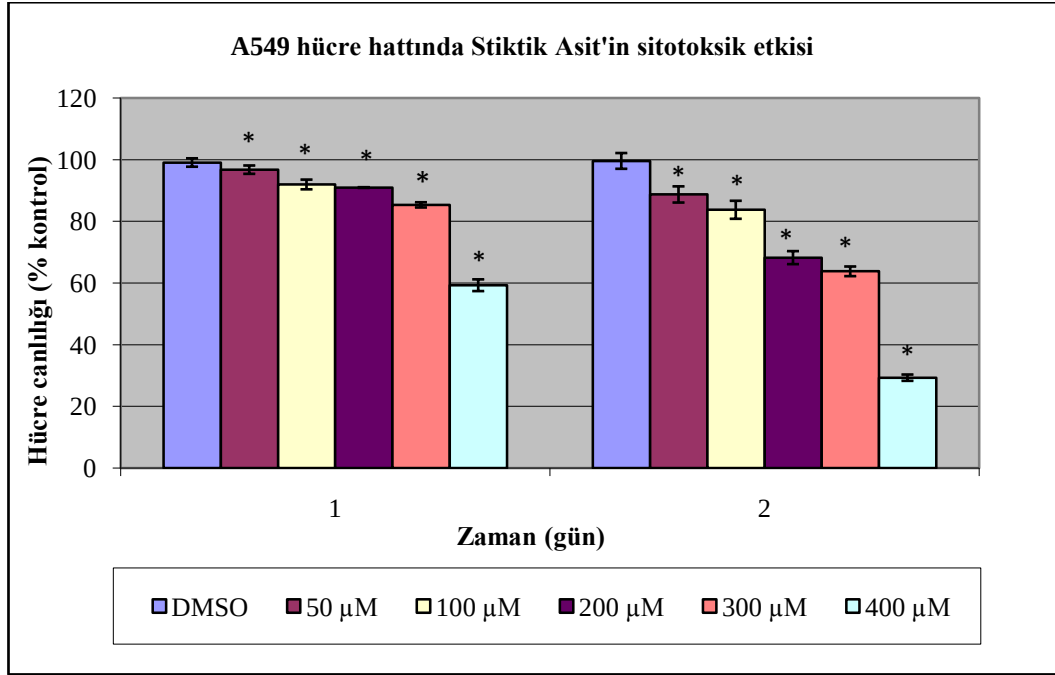


Şekil 3. 19.Salazirik Asit+Atranorin 50 μ M dozunun HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu üzerine etkilerinin görüntüleri A) kontrol B) DMSO C) SLZ100 μ M+ATR50 μ M D) SLZ200 μ M+ATR50 μ M E) SLZ400 μ M +ATR50 μ M Ölçü birimi 100 μ M

Salazirik Asit'in 100, 200 ve 400 μ M'lık dozları ile Atranorin'in 50 μ M dozunun kombinasyonu ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu incelenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 μ M dozunda çok büyük oranda lümenler gözlenmektedir. 200 μ M madde ile muamele edilen hücrelerde ise tüp oluşumunun engellenmeye başladığı gözlenmektedir. 400 μ M dozlarının tüp oluşumunu tamamen engellediği gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak da Salazirik Asit ve Atranorin kombinasyonunun, HUVEC hücre hattında anjiyogenezi engelleyici etki gösterdiği belirlenmiştir.

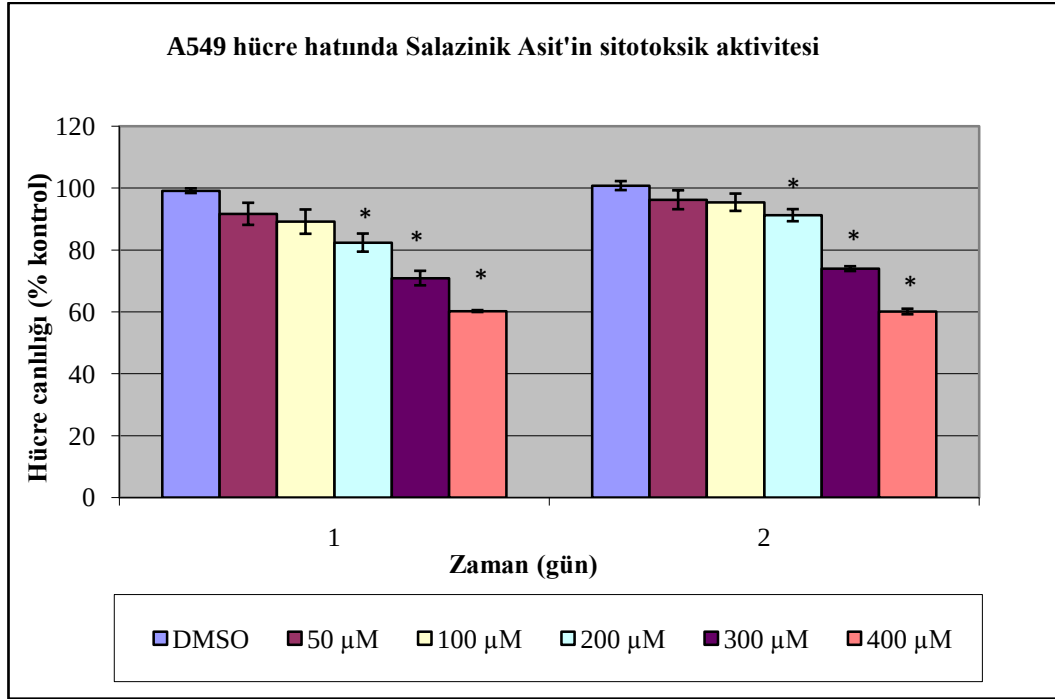
3.2 A549 hücreleriyle yapılan deneyler

3.2.1 Stiktik Asit, Salazininik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının MTT deney sonuçları



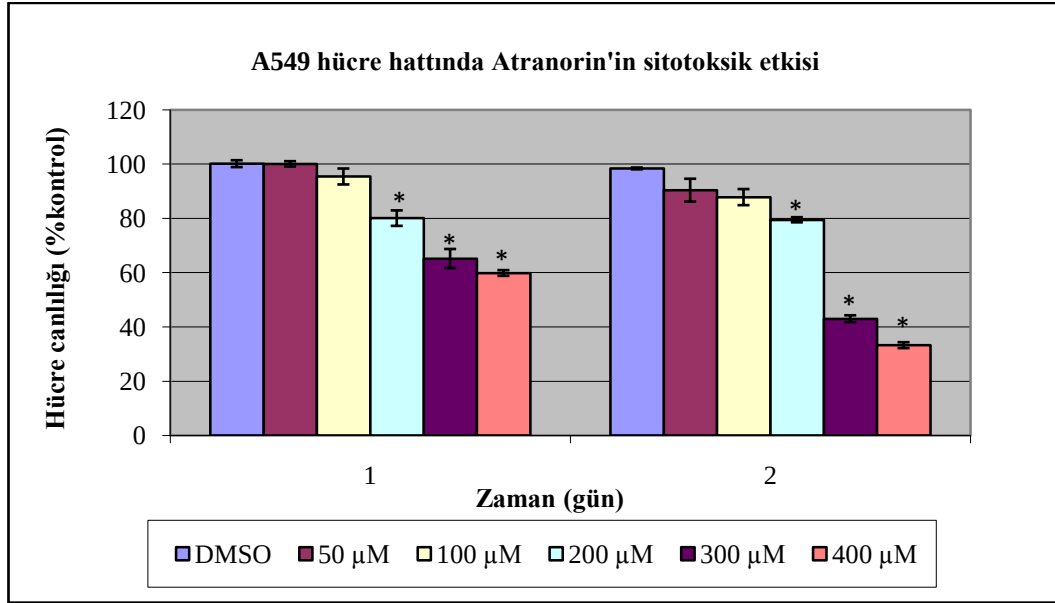
Şekil 3. 20. Stiktik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ölçümü ile değerlendirilmesi
(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Deneyin birinci gününde 50 µM'lık dozunda %4, ikinci gününde %12 oranında hücre canlılığında azalma ölçülmüştür. 100 µM'lık doz ile muamelede hücre canlılığı 24 saat sonunda %91, 48 saat sonunda ise %83 olarak ölçülmüştür. 200 µM'lık madde derişimi hücre canlılığı üzerinde ilk 24 saatte %10, 48 saat sonunda %32 azalmaya neden olmuştur. 300 µM'lık doz ile muamele sonuçlarına bakıldığında ilk 24 saat için hücre canlılığı %85, 48 saat muamele sonunda hücre canlılığı %63 olarak ölçülmüştür. 400 µM'lık doz ilk gün hücre sayısında %41, ikinci gün sonunda %71'lik azalma göstermiştir.



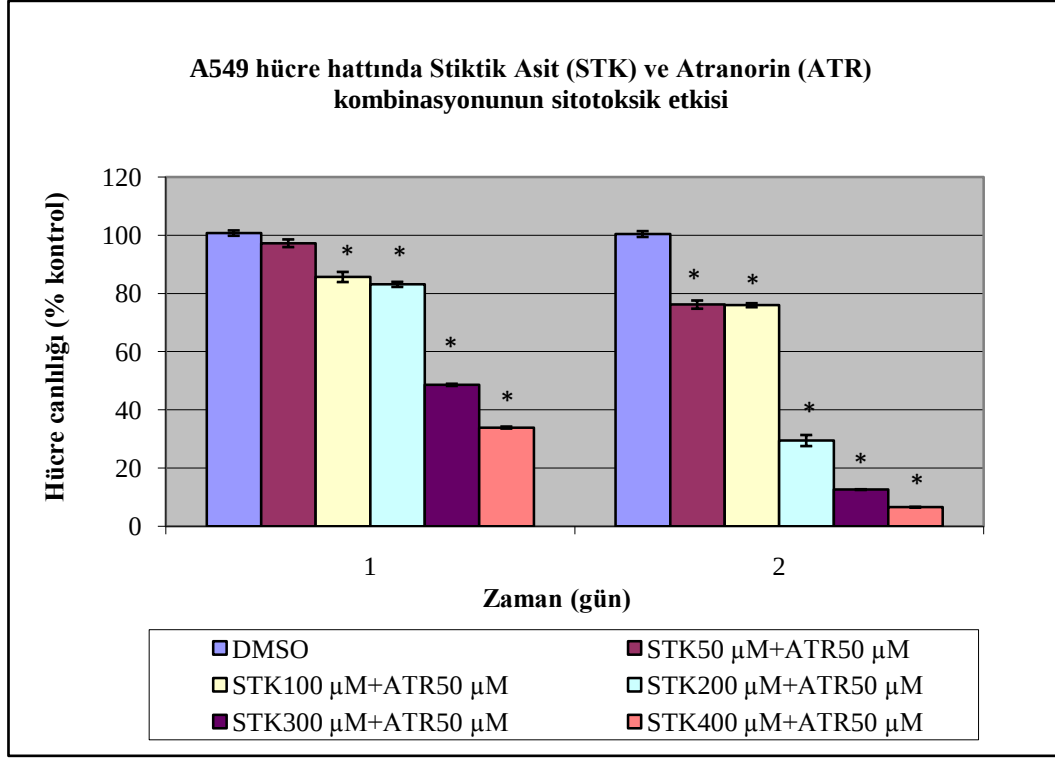
Şekil 3. 21.Salazinik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ölçümü ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Salazinik Asit'in 50µM'lık dozu ile muamele edilen A549 hücre hattında 24 ve 48 saat sonunda hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. 100 µM'lık doz 24 saat sonunda hücre canlılığında %11, 48 saat sonunda ise %5 oranında bir değişikliğe sebep olmuştur. 200 µM'lık doz 24 saat sonunda hücre canlılığı %82, 48 saat sonunda ise %91olarak ölçülmüştür. 300 µM'lık doz ile muamele edilen hücrelerde 24 saat sonunda %30, 48 saat sonunda %27 oranında hücre canlılığı azalmıştır. 400 µM'lık doz ile muamele sonuçlarına bakıldığında ilk gün ve ikinci gün sonunda %40 oranında hücre canlılığında azalma olduğu tespit edilmiştir.



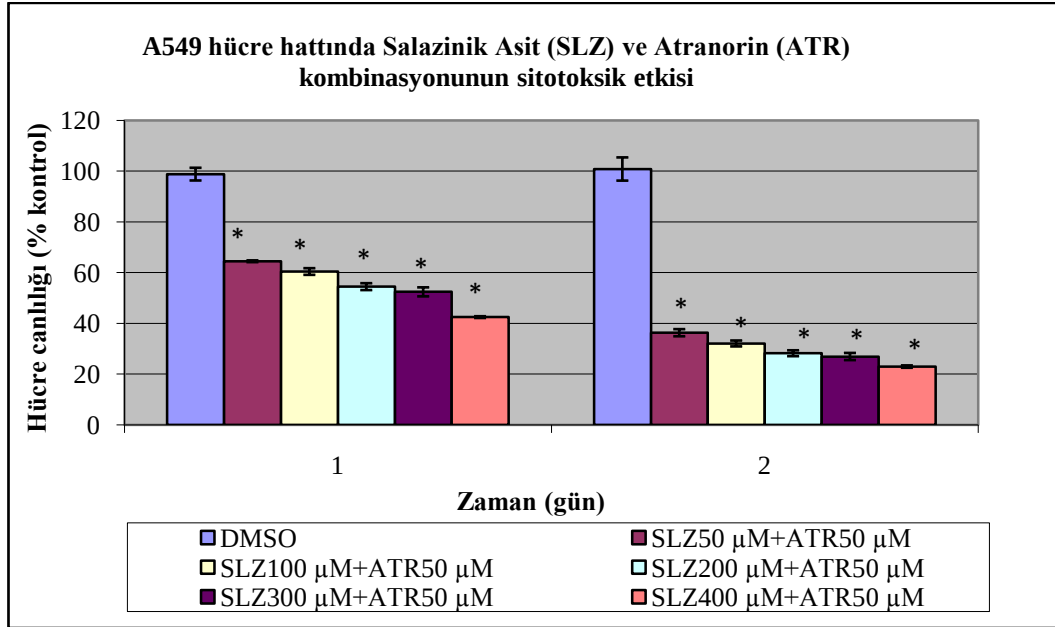
Şekil 3. 22.Atranorin'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ölçümü ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

A549 hücre hattında Atranorin'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μM 'lık dozları denenmiştir. 50 μM dozunda 24 saat sonunda belirgin bir farklılık gözlenmemiştir, 48 saat sonunda ise %90 oranında hücre aktivitesi gözlenmiştir. 100 μM 'lık dozda birinci günün sonunda %5, ikinci günün sonunda ise %13 oranında hücre sayısında azalma tespit edilmiştir. 200 μM dozunda 24 saatte %80, 48 saat sonunda %79 hücre canlılığı belirlenmiştir. 300 μM 'lık dozda ilk gün sonunda %35, ikinci gün sonunda ise %58 oranında hücrelerin canlılık aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. 400 μM dozunda hücre aktivitesi 24 saat sonunda %59, 48 saat sonunda ise %33 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. 23.Stiktik Asit'in bütün dozları ile Atranorin'in 50 μ M doz kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

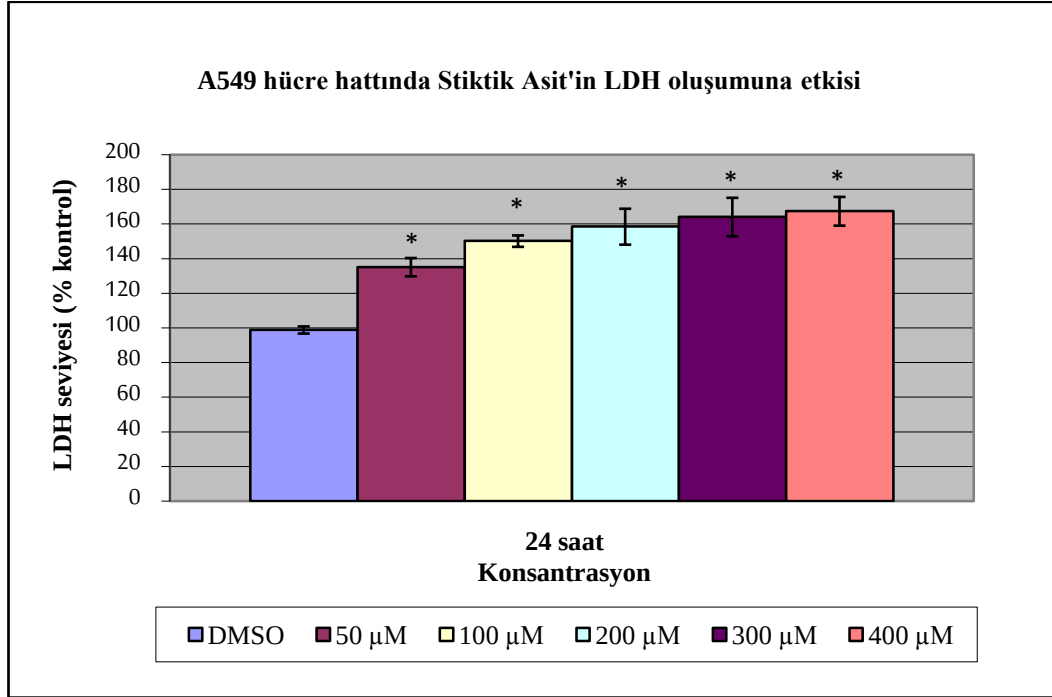
A549 hücre hattında Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μ M'lık dozları ile Atranorin'in 50 μ M'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. STK50+A50 μ M kombinasyonunda 1.gün sonunda %97'lik, 2.gün sonunda ise %76'lık hücre canlılığı belirlenmiştir. STK100+A50 μ M dozunda 1.gün sonunda %15 oranında, 2.gün sonunda %25 oranında hücre sayısında azalma tespit edilmiştir. STK200+A50 μ M kombinasyonunda 1.günde %17 oranında, 2.günde ise %71 oranında hücre sayısında azalma gözlenmiştir. STK300+A50 μ M dozunda 1.gün sonunda hücre çoğalmasındaki düşüş %52 iken, 2.gün sonunda %88 olmuştur. STK400+A50 μ M dozunda 1.gün %33 oranında, 2.gün %6 oranında hücre canlılığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. 24. Salazininik Asit'in bütün dozları ile Atranorin'in 50 µM doz kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

A549 hücre hattında Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları ile Atranorin'in 50 µM'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. SLZ50+A50 µM kombinasyonunda 1.gün sonunda %64, 2.gün sonunda %36 hücre aktivitesi ölçülmüştür. SLZ100+A50 µM dozunda 1.gün %40, 2.gün %68 oranında hücre canlılığında düşüş meydana gelmiştir. SLZ200+A50 µM'da 1.günde %54, 2.günde %28 oranında hücre aktivitesi ölçülmüştür. SLZ300+A50 µM kombinasyonunda 1.gün sonunda hücre çoğalmasındaki düşüş %48 iken, 2.gün sonunda %74 oranında belirlenmiştir. SLZ400+A50 µM dozunda 1.gün hücre oranı %42 iken, 2.gün sonunda %22 olarak ölçülmüştür.

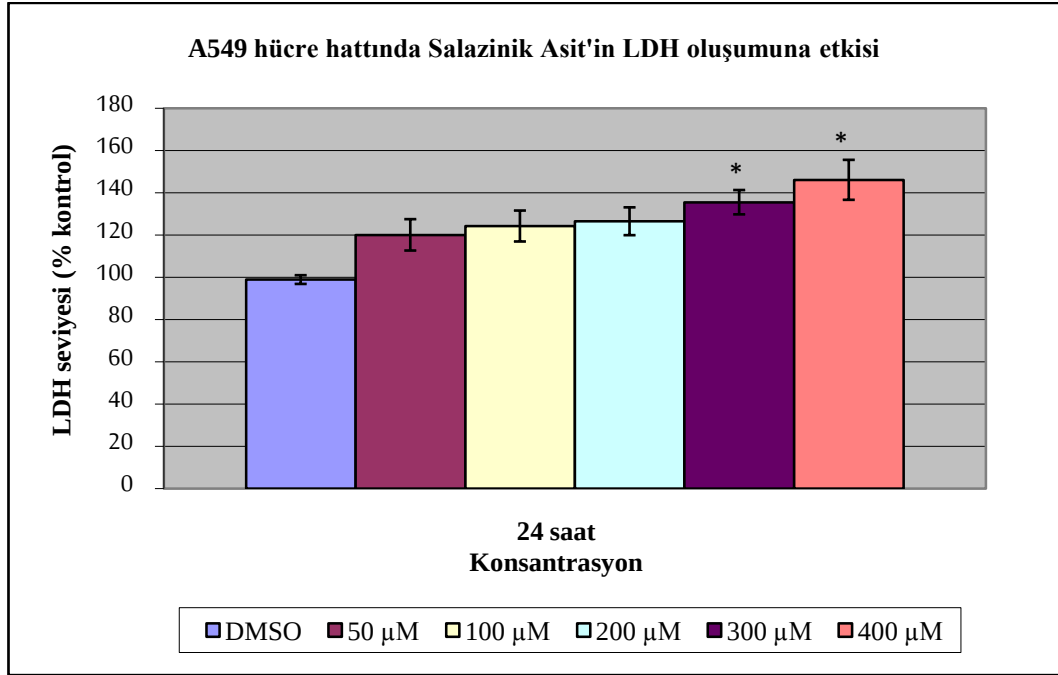
3.2.2 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının LDH deney sonuçları



Şekil 3. 25.Stiktik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi.

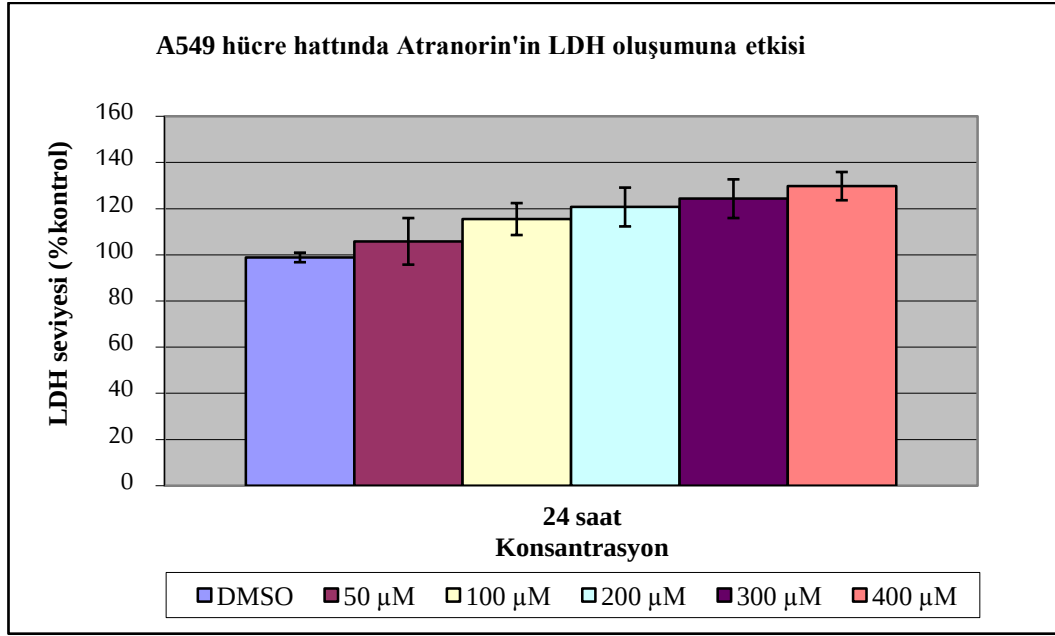
(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Stiktik Asit ile muamele elden A549 hücrelerinde yapılan LDH ölçümünde, LDH aktivitesinde artış beklenmektedir. Şekil 5'da görüldüğü gibi 50, 100, 200, 300 ve 400 μM dozlarında kontrol grubuna göre LDH seviyesinde artış gözlenmiştir. Stiktik Asit hücrelere verildikten 24 saat sonra yapılan ölçümlerde 50 μM dozunda LDH seviyesi %135 olarak ölçülmüştür. STK 100 μM dozunda LDH seviyesindeki artış %50, STK 200 μM dozunda ise %58 olarak belirlenmiştir. STK 300 μM dozunda LDH seviyesi ölçümü %164 olarak belirlenmiştir. STK 400 μM dozunda LDH salınımını % 67 oranında arttırdığı tespit edilmiştir.



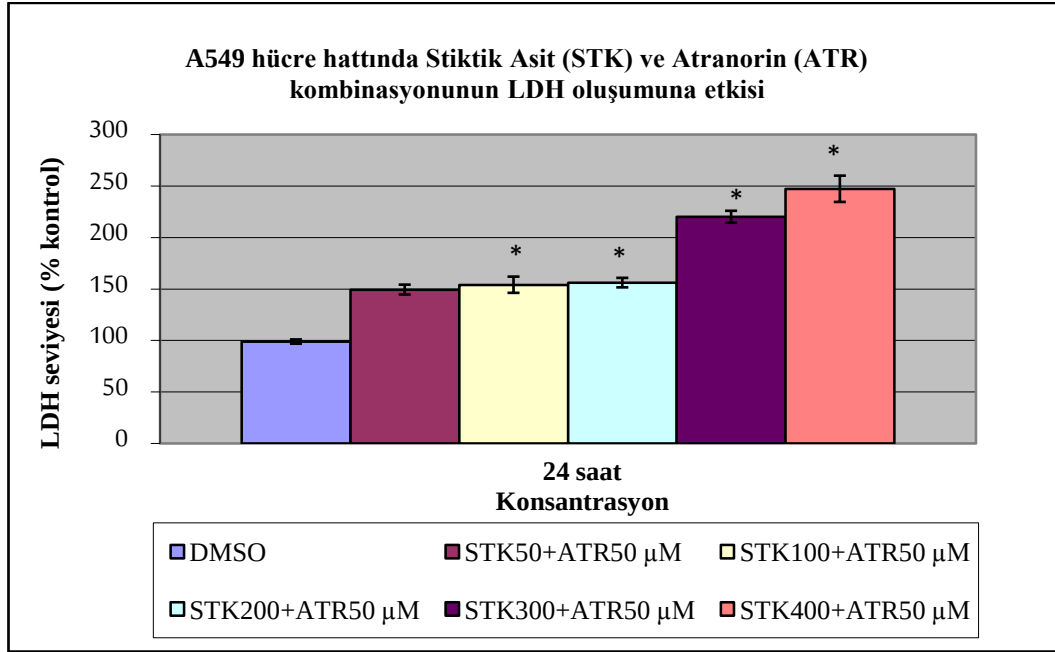
Şekil 3. 26. Salazinik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH ölçümü ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Salazinik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μM 'lık dozlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi LDH testi ile değerlendirilmiştir. Yapılan ölçümlerde 50 μM dozunda LDH seviyesinde %20 oranında artış gözlenmiştir. SLZ 100 μM dozunda LDH seviyesi %124 olarak belirlenmiştir. SLZ 200 μM dozunda ise LDH salınımındaki artış %26 ölçülmüştür. SLZ 300 μM dozunda LDH ölçümü %135 olarak belirlenmiştir. SLZ 400 μM dozunda LDH salınımında %46 artış tespit edilmiştir.



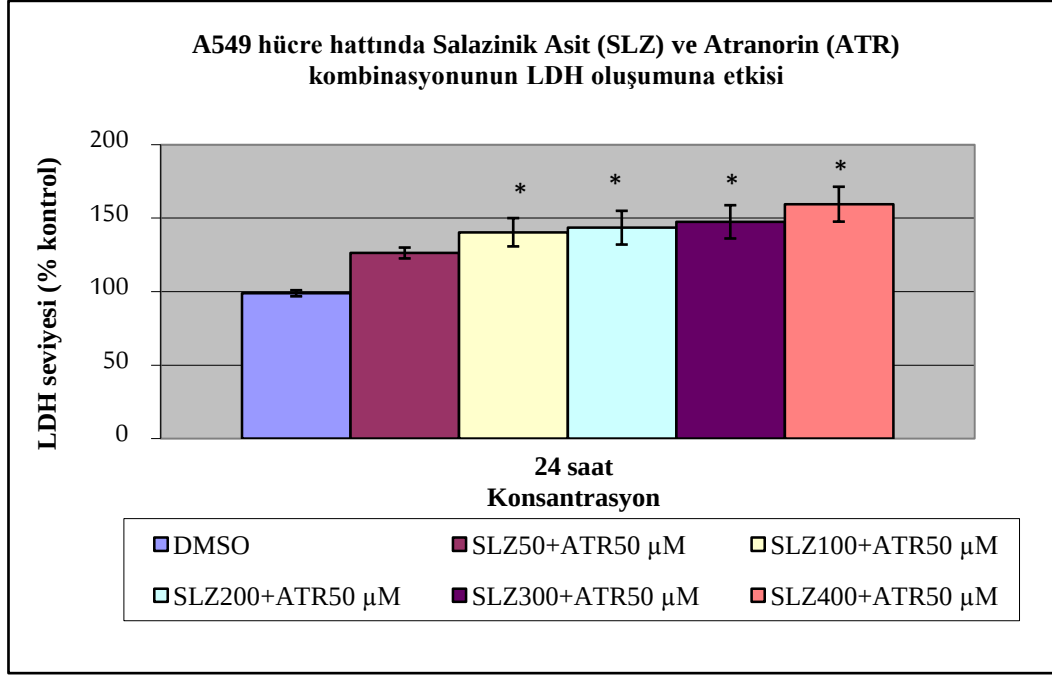
Şekil 3. 27.Atranorin'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

A549 hücre hattında Atranorin'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μM 'lık dozlarının LDH oluşumuna etkisi denenmiştir. Atranorin hücrelere verildikten 24 saat sonra yapılan ölçümlerde 50 μM dozunda LDH seviyesinde %5 oranında artış gözlenmiştir. ATR 100 μM dozunda LDH seviyesindeki artış %15 e kadar çıkmıştır. ATR 200 μM dozunda ise %20 LDH aktivitesi gözlenmiştir. ATR 300 μM dozunda LDH ölçümü %24 olarak belirlenmiştir. ATR 400 μM dozunda LDH salınımını %29 oranında arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. 28. Stiktik Asit ve Atranorin (50µM) kombinasyonunun A549 hücreleri üzerinde etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

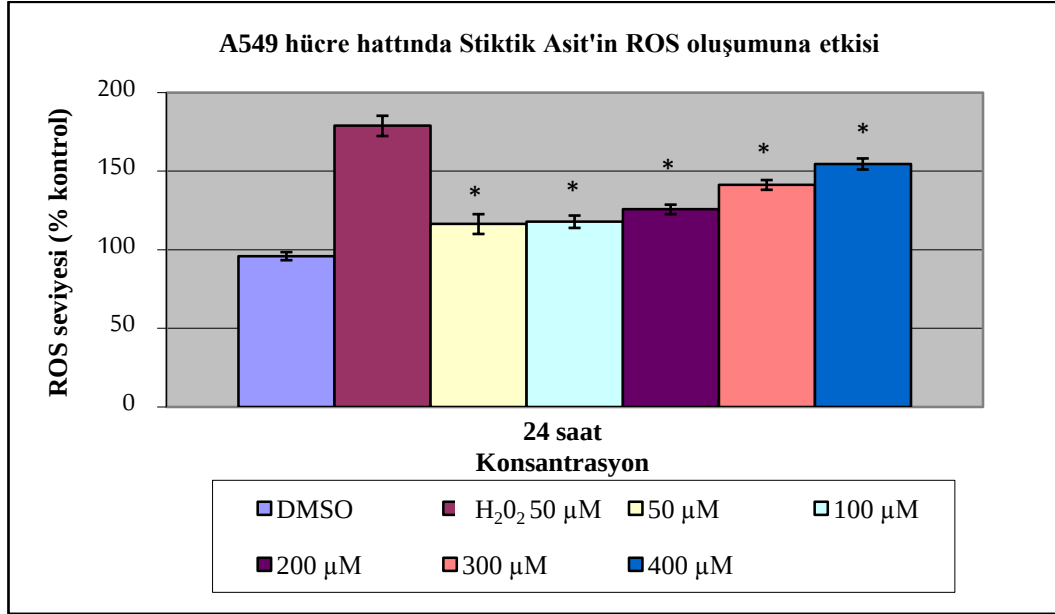
A549 hücre hattında Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları ile Atranorin'in 50 µM'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. Bu kombinasyonda LDH salınımının çok daha etkin olduğu görülmüştür. STK50+A50 µM dozunda %49 oranında LDH aktivitesinde artış belirlenmiştir. STK100+A50 µM dozunda %54 oranında LDH salınımında artış ölçülmüştür. STK200+A50 µM kombinasyonunda %56 oranında LDH seviyesi gözlenmiştir. STK300+A50 µM dozunda LDH seviyesinde %119 artış ölçülmüştür. STK400+A50 µM dozunda %147 oranında LDH salınımı tespit edilmiştir.



Şekil 3. 29.Salazininik Asit ve Atranorin (50 μ M) kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

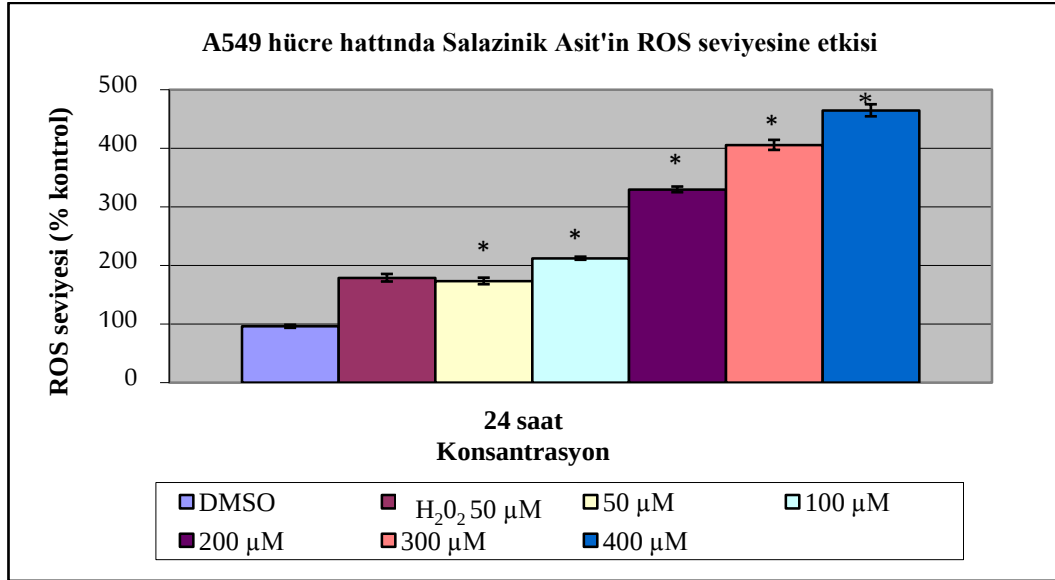
A549 hücre hattında Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 μ M'lık dozları ile Atranorin'in 50 μ M'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. Bu iki madde ayrı ayrı denendiğinde LDH seviyesinde az miktarda artış belirlenmiştir. Ancak kombinasyonu yapılan bütün dozlarda LDH seviyesinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. Kombinasyonda SLZ50+A50 μ M dozunda %26'lık LDH aktivitesi belirlenmiştir. SLZ100+A50 μ M dozunda %40 oranında LDH salınımında artış ölçülmüştür. SLZ200+A50 μ M kombinasyonunda %43 oranında LDH seviyesi gözlenmiştir. SLZ300+A50 μ M dozunda LDH seviyesinde %47 artış ölçülmüştür. SLZ400+A50 μ M dozunda %59 oranında LDH salınımı tespit edilmiştir.

3.2.3 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının ROS oluşumuna etkileri



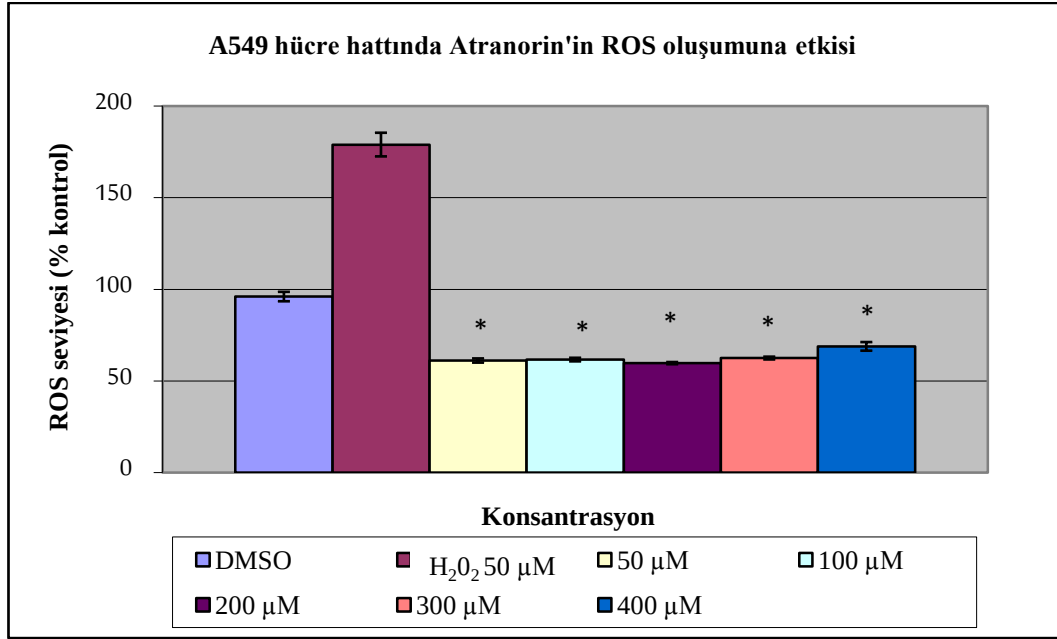
Şekil 3. 30.Stiktik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi ROS testi ile değerlendirilmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Stiktik Asit'in en yüksek dozunun bile H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stres oranını geçmemesi beklediğimiz sonuçlar arasındadır. H₂O₂ seviyesine göre Stiktik Asit'in dozları değerlendirildiğinde bütün dozların ROS oluşturduğu gözlenmiştir. 50 µM dozunun %116, 100 µM dozunun %117 oranında oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. 200 µM dozu %125 seviyesinde ROS oluşturmuştur. 300 µM dozu %141 oranında, 400 µM dozu ise %154 oranında oksidatif stres oluşturduğu belirlenmiştir.



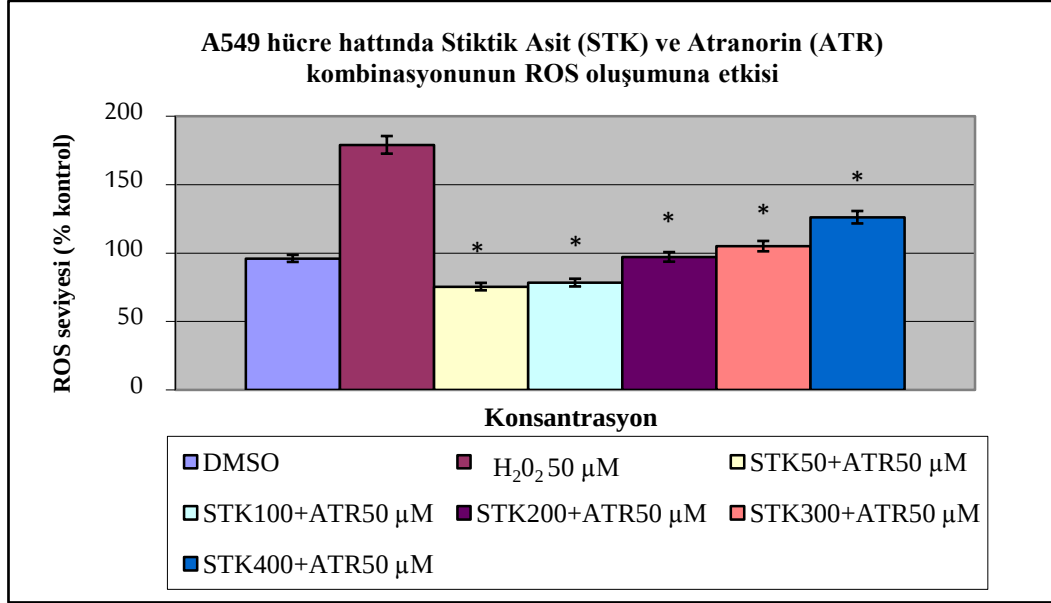
Şekil 3. 31.Salazininik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi ROS testi ile değerlendirilmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Salazininik Asit'in 50 µM dozu haricindeki bütün dozlarında H₂O₂ oranının geçildiği görülmektedir. 50 µM dozunun %173 oranında oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozlarının ise yüksek miktarlarda ROS oluşturduğu görülmüştür. 100 µM dozunda %212, 200 µM dozunda %329, 300 µM dozunda %405, 400 µM dozunda ise %464 oranında ROS ölçümü yapılmıştır. Bu sonuçlara bakıldığında Salazininik Asit'in A549 hücre hattında oksidatif strese sebep olduğu belirlenmiştir.



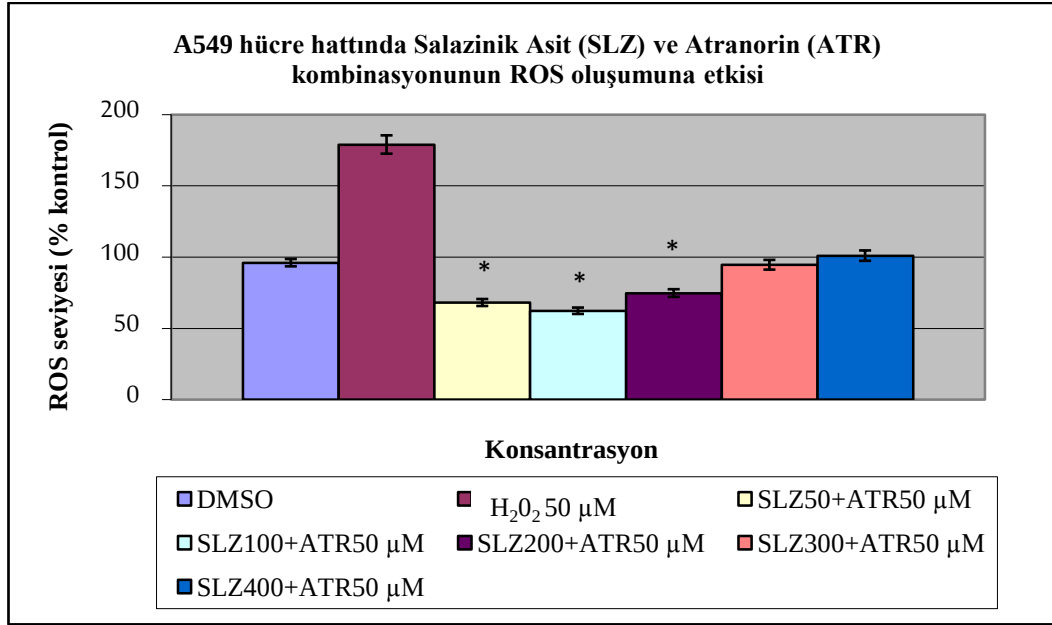
Şekil 3. 32.Atranorin'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Atranorin'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi ROS testi ile değerlendirilmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Atranorin'in en yüksek dozunun bile H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stres oranını geçmemesi beklediğimiz sonuçlar arasındadır. Dozların kontrol grubundan daha düşük oksidatif strese sebep olması Atranorin'in koruyucu özellik gösteriyor olabileceğinin göstergesidir. 50, 100 ve 200 µM dozlarında kontrol grubuna göre %35 oranında ROS oluşumunu engellemiştir. 300 µM dozunun %34 oranında, 400 µM dozunun ise %26 oranında oksidatif stres oluşumunu engellediği belirlenmiştir.



Şekil 3. 33.Stiktik Asit ve Atranorin (50µM) kombinasyonunun A549 hücreleri üzerinde etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

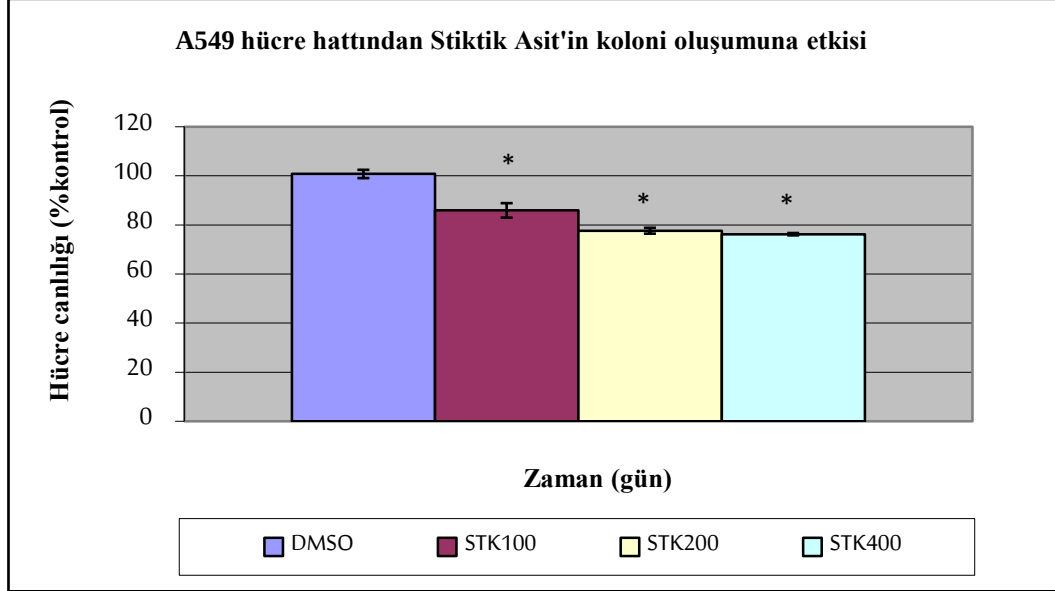
A549 hücre hattında Stiktik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları ile Atranorin'in 50 µM'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Stiktik Asit ve Atranorin'in en yüksek dozunun bile H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stres oranını geçmemesi beklediğimiz sonuçlar arasındadır. STK50+A50 µM dozunda %75 oranında, STK100+A50 µM dozunda ise %78 ROS aktivitesi belirlenmiştir. STK200+A50 µM dozunda %97, STK300+A50 µM dozunun %104 oranında, STK400+A50 µM dozunun ise %126 oranında oksidatif stres oluşturduğu ölçülen sonuçlardandır. Stiktik Asit'in en yüksek dozunda %154 oranında, Atranorin'de ise %68 oranında ROS aktivitesi ölçülmüştür. Bu iki maddenin kombinasyonundan daha yüksek düzeyde bir ROS aktivitesi beklenirken STK400 ve ATR50 µM kombinasyonunda %126 oranında aktivite belirlenmiştir. Dozların H₂O₂'den daha düşük oksidatif strese sebep olması Atranorin'in koruyucu özelliği olabileceğinin göstergesidir.



Şekil 3. 34. Salazininik Asit ve Atranorin (50µM) kombinasyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

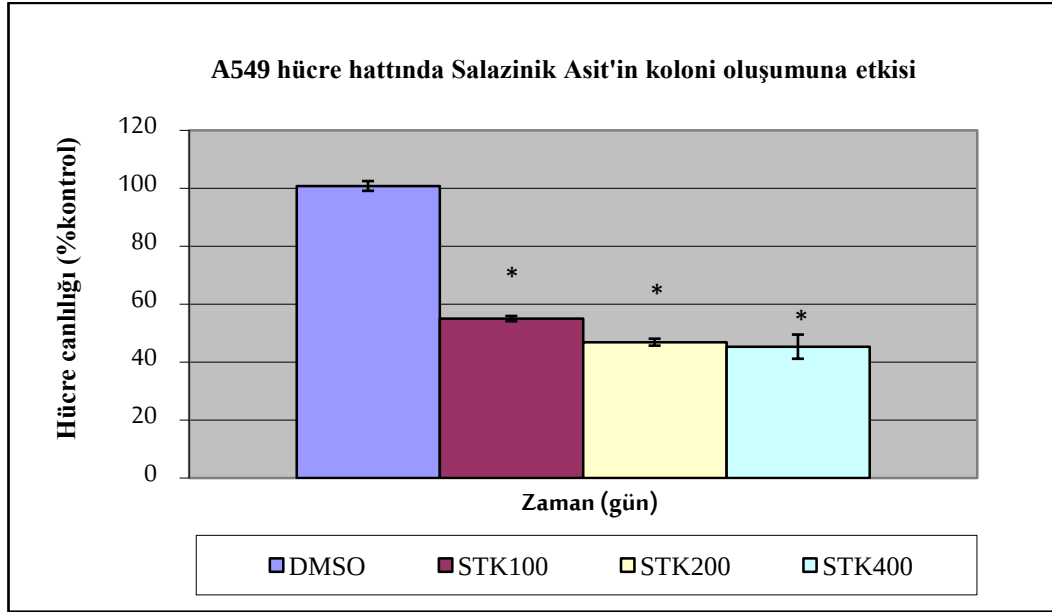
A549 hücre hattında Salazininik Asit'in 50, 100, 200, 300 ve 400 µM'lık dozları ile Atranorin'in 50 µM'lık dozu kombine edilerek denenmiştir. H₂O₂ oranı 50 µM olarak ayarlanmıştır. Salazininik Asit ve Atranorin'in en yüksek dozunun bile H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stres oranını geçmemesi beklediğimiz sonuçlar arasındadır. SLZ50+A50 µM dozunda %168 oranında, SLZ100+A50 µM dozunda ise %162 ROS aktivitesi belirlenmiştir. SLZ200+A50 µM dozunda %174, SLZ300+A50 µM dozunun %194 oranında, SLZ400+A50 µM dozunun ise %200 oranında oksidatif stres oluşturduğu ölçülen sonuçlardandır. Salazininik Asit'in en yüksek dozunda %464 oranında, Atranorin'de ise %68 oranında ROS aktivitesi ölçülmüştür. Bu iki maddenin kombinasyonundan daha yüksek düzeyde bir ROS aktivitesi beklenirken SLZ400 ve ATR50 µM kombinasyonunda %100 oranında aktivite belirlenmiştir. Bu kombinasyonun Salazininik Asit'in tek başında uygulanmasından daha düşük oranda oksidatif strese sebep olması, Atranorin'in Salazininik Asit üzerinde oksidatif stres oluşumunu engelleyici bir etkisi olabileceğini belirtmektedir.

3.2.4 Stiktik Asit, Salazinik Asit, Atranorin ve kombinasyonlarının koloni oluşumuna etkileri



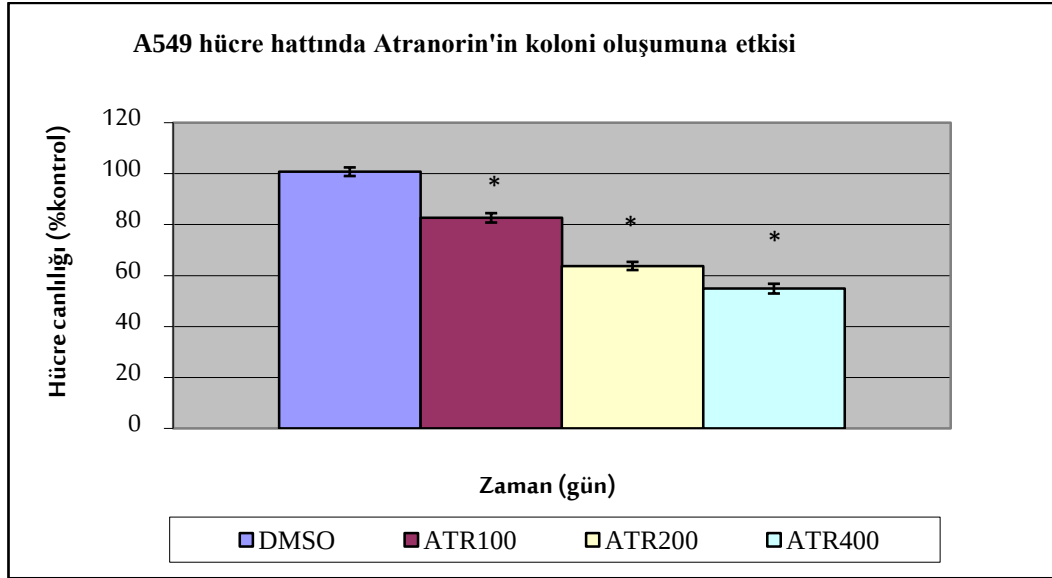
Şekil 3. 35.Stiktik Asit'in A549 hücreleri üzerindeki etkisinin koloni formasyon deneyi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

A549 hücre hattında Stiktik Asit'in koloni oluşumuna etkisi yapılan deneyle belirlendi. Elde edilen verilere göre; STK 100 μM dozunda kontrol grubuna göre oluşan koloni sayısında %15 oranında bir azalma gözlenmiştir. 200 μM dozunda ise hücrelerin %77 oranında koloni oluşturduğu belirlenmiştir. 400 μM dozunda koloni oluşumunu %24 oranında engellediği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir.



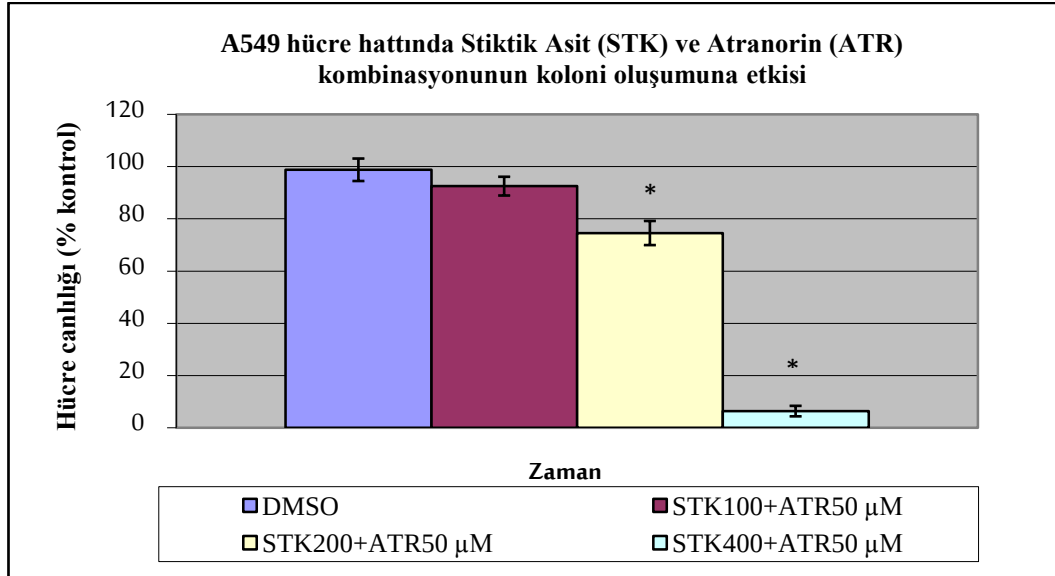
Şekil 3. 36.Salazininik Asit'in A549 hücreleri üzerinde koloni oluşumuna etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir

A549 hücre hattında Salazininik Asit'in koloni oluşumuna etkisi yapılan deneyle belirlenmiştir. SLZ 100 μ M dozunda oluşan koloni oranı %54 olarak belirlenmiştir. 200 μ M dozunda koloni oluşumu %54 oranında engellenmiştir. 400 μ M dozunda oluşan koloni oranı %45 olarak belirlenmiştir.



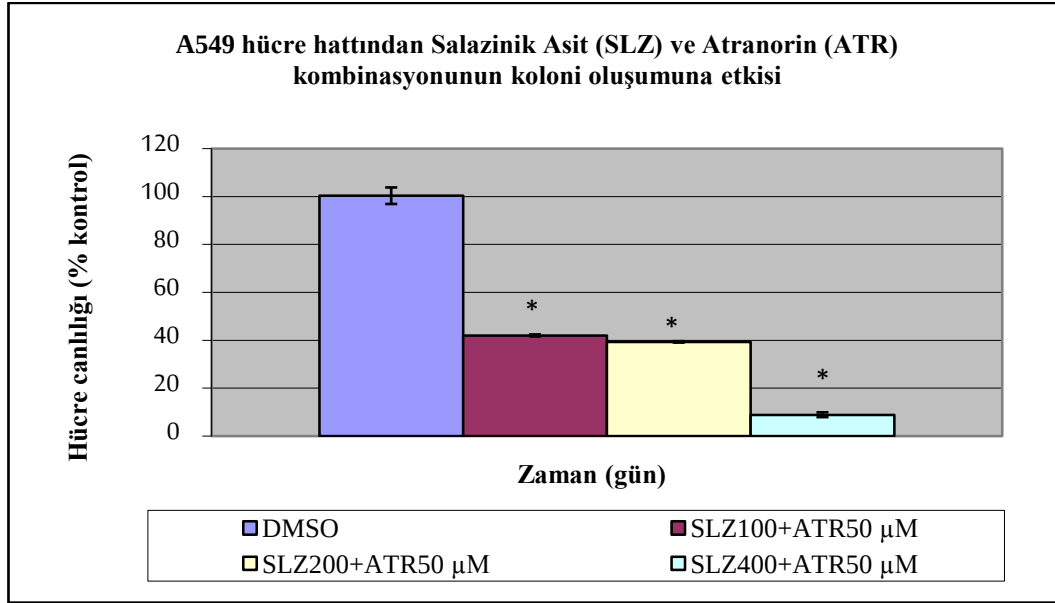
Şekil 3. 37.Atranorin'in A549 hücreleri üzerinde koloni oluşumuna etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir

A549 hücre hattında Atranorin'in koloni oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla 15 gün boyunca büyümeye bırakılan koloniler, 15 gün sonunda sayılarak veriler elde edilmiştir. 100 μ M dozunda Atranorin koloni oluşumunu %18 oranında engellemiştir. 200 μ M dozunda oluşan koloni oranı %63 olarak belirlenmiştir. 400 μ M dozunda Atranorin koloni oluşumunu %46 oranında engellemiştir.



Şekil 3. 38.Stiktik Asit'in 100, 200, 400 µM dozları ile Atranorin'in 50 µM dozunun kombinasyonunun A549 hücreleri üzerinde koloni oluşumuna etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir

A549 hücre hattında Stiktik Asit'in dozları ile Atranorin'in 50 µM dozu birleştirilerek denenmiştir. Kombinasyonun koloni oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla 15 gün boyunca büyümeye bırakılan koloniler, 15 gün sonunda sayılarak veriler elde edilmiştir. STK100+A50µM dozunun koloni oluşumunda kontrol grubuna göre %8 oranında bir azalma gözlenmiştir. STK200+A50µM dozunda oluşan koloni oranı %74 olarak belirlenmiştir. STK400+A50µM dozunda Atranorin koloni oluşumunu %94 oranında engellemiştir.



Şekil 3. 39. Salazininik Asit'in 100, 200, 400 μ M dozları ile Atranorin'in 50 μ M dozunun kombinasyonunun A549 hücreleri üzerinde koloni oluşumuna etkisi (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir

A549 hücre hattında Salazininik Asit'in 100, 200, 400 μ M dozları ile Atranorin'in 50 μ M dozunun kombinasyonu yapılmıştır. Kombinasyonun koloni oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla 15 gün boyunca büyümeye bırakılan koloniler, 15 gün sonunda sayılarak veriler elde edilmiştir. SLZ100+A50 μ M dozunda koloni oluşumu %41 oranında gözlenmiştir. SLZ200+A50 μ M dozunda koloni A549 hücrelerinin koloni oluşturması %61 oranında engellenmiştir. SLZ400+A50 μ M dozunda koloni oluşan koloninin %8 oranında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 1. Deney maddelerinin HUVEC ve A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT, LDH, ROS, Tüp ağı oluşumu, Koloni oluşumu deneyleri ile değerlendirilmesi

Deney maddeleri	Hücreler		Deneyler
	HUVEC	A549	
Stiktik asit	Az etkili	Az etkili	MTT
Salazinik asit	Az etkili	Az etkili	
Atranorin	Etkili	Etkili	
Stiktik asit ve Atranorin	Çok etkili	Çok etkili	
Salazinik asit ve Atranorin	Az etkili	Çok etkili	
Stiktik asit	Etkili	Etkili	LDH
Salazinik asit	Az etkili	Az etkili	
Atranorin	Az etkili	Az etkili	
Stiktik asit ve Atranorin	Az etkili	Çok etkili	
Salazinik asit ve Atranorin	Az etkili	Etkili	
Stiktik asit	Etkili	Etkili	ROS
Salazinik asit	Etkili	Çok etkili	
Atranorin	Az etkili	Az etkili	
Stiktik asit ve Atranorin	Az etkili	Az etkili	
Salazinik asit ve Atranorin	Çok etkili	Az etkili	
Stiktik asit	Az etkili		Tüp Ağı Oluşumu
Salazinik asit	Az etkili		
Atranorin	Etkili		
Stiktik asit ve Atranorin	Çok etkili		
Salazinik asit ve Atranorin	Etkili		
Stiktik asit		Az etkili	Koloni oluşumu
Salazinik asit		Çok etkili	
Atranorin		Etkili	
Stiktik asit ve Atranorin		Çok etkili	
Salazinik asit ve Atranorin		Çok etkili	

4 TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Likenler dünya üzerinde geniş yayılış gösteren, zorlu koşullarda hayatta kalmayı başarabilen simbiyotik organizmalardır. Kayaların, ağaç gövdelerinin ve dallarının üzerinde, toprakta çeşitli renk ve şekillerde bulunurlar (Koçer 2012). Likenler mantar ve alg birlikteliğinden meydana gelirler. Alternatif tıp alanında yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmışlardır. Sentezledikleri çeşitli sekonder metabolitlerle araştırmacıların ilgisini çekmektedirler. Bu sekonder metabolitlerin antiproliferatif, antitümöral, antianjiyojenik, antibiyotik, antifungal ve sitotoksik etkilerinin olduğu yapılan araştırmalar sonucunda bulunmuştur. Sentetik ilaç hammaddelerine göre daha az yan etkiye sahip olmalarından dolayı son yıllarda sekonder metabolitler ile yapılan araştırmalarda artış gözlenmiştir.

Likenler farklı sınıflara sahip fenolik sekonder metabolitlerin en iyi bilinen kaynaklarıdır. Bu sekonder metabolitler tek çekirdekli fenoller (örn; Orsinol ve b-orsinol), kinonlar (örn; parietin), dibenzofuranlar (örn; pannarik asit), depsidonlar (örn; salazinik asit), depsonlar (örn; pikrolikenik asit), depsidler (örn; homosekikaik asit), y-laktonlar (örn; protolikenesterinik asit), pulvinik asit türevleri (örn; vulpinik asit) ve ksantonları (örn; likenksanton) da içermektedirler (Yousuf ve ark. 2014). Liken bileşiklerinin farklı işlevsel grupları sitotoksosite seviyelerini etkiler. Kanser hücrelerinin büyümesinin ve gelişmesinin kontrolünde hücre siklusunun düzenlenmesi önemlidir. Çeşitli liken asitlerinin hücre döngüsünün G1 öncesinde ya da S fazında kanser büyümesini durdurduğu tespit edilmiştir. Çeşitli kanserli hücrelerde hücre ölüm mekanizması liken metabolitleri tarafından apoptoz, nekroz ve anjiyogenezin engellenmesine sebep olmaktadır (Shrestha ve St.Clair 2013).

Kanser terapilerinde sağlıklı hücrelere zarar vermeden sadece kanserli hücreleri ortadan kaldıracı ilaç maddeleri araştırılmaktadır. Dünya çapında 1.3 milyon kişinin akciğer kanserinden öldüğü rapor edilmiştir (Bleau ve ark. 2014). Kanserden ölümlerin bir nedeni de tedavi için kullanılan ilaçların kanserli hücrelerle birlikte sağlıklı hücreleri de öldürmesidir.

Bu tez çalışmasında yüzyıllardır hastalıkların tedavisinde kullanılan likenlerden elde edilen sekonder metabolitlerin hücre canlılığını inhibe etme yetenekleri, anjiyogenez oluşumunu engelleme kapasiteleri, kanserli hücrelerin koloni oluşturmalarına etkileri, oksidatif stres ve laktat dehidrojenaz oluşturmaları üzerindeki etkileri, sağlıklı ve kanserli iki farklı hücre hattı kullanılarak araştırılmıştır.

Liken bileşiklerinin farklı işlevsel grupları sitotoksikite seviyelerini etkiler (Shrestha ve St.Clair 2013). Tez çalışmasında kullanılan Stiktik asit, Salazinik asit ve Atranorin'in tek başlarına ve ikili kombinasyon şeklinde A549 ve HUVEC hücrelerinin sitotoksik etkilerini saptamak için MTT ve LDH testleri yapılmıştır. Tez çalışmasında Çizelge 3.1' de verilen sonuçlara bakarak HUVEC hücresinde yapılan MTT deneylerinden elde edilen sonuçlara göre Stiktik asit ve Salazinik asit'in etkisinin az olduğu, Atranorin'in ise 400 μ M dozunda 24 saat sonunda hücre canlılığını % 56 düşürdüğü bulunmuştur (Şekil 3.3). Stiktik Asit ve Atranorin birlikte kullanıldığında (Şekil 3.4) ayrı ayrı kullanıldıklarından (Şekil 3.1, Şekil 3.3) daha etkili olduğu, Salazinik asit ile Atranorin'in (Şekil 3.5) ise daha az sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. A549 hücre hattında ise Stiktik asit (Şekil 3.21) ve Atranorin (Şekil 3.23), doza bağlı olarak anlamlı sitotoksik etkiler göstermişlerdir. Sekonder metabolitlerin kombinasyonlarında daha yüksek sitotoksik etki gözlenmiştir.

Liken asitleri ile muamele edilen hücrelerin medyumlarındaki LDH seviyesi ölçülerek Çizelge 3.1'deki sonuçlar elde edilmiştir. Deney sonuçlarına göre Stiktik asit ve Salazinik asit'in HUVEC hücrelerine tek başına uygulandığında, Atranorin ile kombinasyonundan daha yüksek oranda LDH oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10). A549 hücre hattında ise en etkin bileşik Stiktik asit olmuştur (Şekil 3.26). Stiktik asit ile Atranorin kombinasyonunda ise LDH oranı kontrol grubunun iki katından daha fazla olmuştur (Şekil 3.29). Salazinik asit ile Atranorin'in kombinasyonunda ayrı uygulandıklarından farklı bir sonuç çıkmamıştır (Şekil 3.30).

Bačkorova ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada Atranorin varlığında HT-29 hücrelerinde ROS üretiminde artış gözlenmemişken, A2780 hücre hattında 200 μ M dozunda ROS üretiminde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Farklı hücre hatlarında farklı liken sekonder metabolitlerinin (usnik asit, atranorin ve giroforik asit) ROS üretimini düşürdüğü gözlenmiştir (Pavlovic ve ark. 2013). A549 ve HUVEC hücreleri Atranorin ile muamele edildiğinde ölçülen ROS seviyesi en yüksek dozlarda dahi kontrol grubundan düşük çıkmıştır. Bu durum Atranorin'in oksidatif stres üzerinde koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, HUVEC hücresinde ROS oluşumunu en fazla Salazinik Asit'in (Şekil 3.12), en az ise Atranorin'in (Şekil 3.13) etkilediği görülmüştür. Kombinasyon deneyleri sonucunda, Atranorin'in Stiktik ve Salazinik asit'in etkisini düşürdüğü sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 3.14, Şekil 3.15). ROS seviyelerine bakarak Atranorin'in HUVEC hücresi üzerinde oksidatif stres oluşumunu engelleyici bir etki gösterdiği söylenebilir. A549 hücre hattında ROS seviyesi en yüksek Salazinik asit'te (Şekil 3.32), en düşük ise Atranorin'de (Şekil 3.33) çıkmıştır. Bu sonuç HUVEC hücreleri ile paralellik göstermiştir. Kombinasyonlarda Atranorin'in Salazinik asit üzerinde oksidatif stres oluşumunu engelleyici bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. Sonuçlar Çizelge 3.1'de tablo halinde verilmiştir.

Literatürde liken sekonder metabolitlerinin anjiyojenez üzerine etkileri hakkında az sayıda yayın bulunmaktadır (Koparal ve ark. 2010; Song ve ark. 2010). Tez çalışması kapsamında üç sekonder metabolitin tek başlarına ve ikili kombinasyon şeklinde anjiyojeneze etkileri araştırılarak literatüre katkı sağlanmıştır. HUVEC hücresinde deneylerde kullanılan sekonder metabolitlerin tüp ağı oluşumlarına etkisi incelenmiştir. Anjiyojenez üzerinde en etkili olan sekonder metabolit Atranorin (Şekil 3.18), etkisi en düşük metabolit ise Salazinik asit (Şekil 3.17) olmuştur. Kombinasyon sonuçlarında ise Atranorin'in diğer liken asitlerinin anjiyojenik etkisini azalttığı, damar oluşumunu düşük dozlardan itibaren engellemeye başladığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışması ile Stiktik asit, Salazinik asit ve Atranorin'in anjiyogenez üzerindeki etkileri tek başlarına ve kombinasyon olarak uygulanmaları sonucunda gözlemlenmiştir. Yeni antianjiyogenik ilaçların keşfi kanser tedavisinde son yıllarda önem kazanmıştır.

Çeşitli kanserli hücrelerde hücre ölüm mekanizması liken metabolitleri tarafından apoptoz, nekroz ve anjiyogenezin engellenmesine sebep olmaktadır (Shrestha ve St.Clair 2013). Kanser tedavisinde kullanılan maddelerin sağlıklı hücre hattına zarar vermeden kanserli hücreleri öldürmesi amaçlanmaktadır. Tez çalışmasında Salazinik asit ve Atranorin kombinasyonunun sitotoksik testlerde sağlıklı hücrelerde (HUVEC) az etkili, kanserli hücrelerde (A549) ise çok etkili olduğu belirlenmiştir.

LDH seviyesindeki artış hücre zarının hasar gördüğünün belirticidir. Stiktik asit ve Atranorin kombinasyonu ile Salazinik asit ve Atranorin kombinasyonunun HUVEC hücrelerinde az etkili, A549 hücrelerinde ise daha etkili olduğu gözlenmiştir. Hücrelerde oksidatif stresin oluşmasında Salazinik asit HUVEC hücrelerinde etkili olurken A549 hücrelerinde çok etkili olmuştur. Kanserli hücrenin beslenerek büyümesini sağlayan en önemli faktör anjiyogenezdir. Anjiyogenezin engellenmesi tümör hücresinin besinsiz kalarak ölmesi anlamına gelmektedir. Yapılan deneyler sonucunda özellikle Atranorin'in tüp ağı oluşumunu engellediği, Stiktik asit ve Salazinik asit ile kombinasyonlarında ise bu maddelerin etkisini arttırdığı belirlenmiştir.

Kanserli hücreler bulundukları yerde ya da göç ettikleri yerlerde koloniler oluştururlar. Koloni oluşumunun engellenmesi tümörün büyümesini, gelişmesini ve canlıya zarar vermesini engeller. Koloni formasyon deneyleri antitümöral etkiyi gösterebilmek bakımından araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Sekonder metabolitlerden özellikle kombinasyon sonuçları ile Salazinik asit'in A549 hücrelerinde koloni oluşumu üzerinde çok etkili olduğu görülmüştür.

A549 hücreleri yumuşak agar koloni formasyonu deneyinde liken asitleri ile muamele edilmiştir. Salazinik asit hücrelerin koloni oluşturmalarını doza bağlı olarak en çok engelleyen madde olmuştur (Şekil 3.37). Stiktik asit ve Atranorin

kombinasyonunda 200 μ M ve üzerinde koloni oluşumunu engellediği, Salazinin asit ve Atranorin kombinasyonunda ise 100 μ M dozunda dahi % 41 oranında koloni oluşumunun engellendiği yapılan deneylerle belirlenmiştir (şekil 3.39, 3.40).

Sonuçların hepsi birlikte değerlendirildiğinde tezde kullanılan likenlerden izole edilen sekonder metabolitlerin sitotoksik, antianjiyojenik, antitümöral, antioksidan, antiproliferatif etkilerinin olduğu bulunmuştur.

Deneyler *in vitro* ortamda yapılmıştır. Bulunan sonuçlardan faydalanabilmek için sekonder metabolitlerin *in vivo* araştırmalarının da yapılması gerekmektedir. Böylece kanserle savaşta sağlık endüstrisine yeni ilaç etken bileşiklerinin kazandırılmasından söz edilebilir olacaktır.

KAYNAKLAR

- Armaleo, D., Zhang, Y., Cheung, S. (2008), “Light might regulate divergently depside and depsidone accumulation in the lichen *Parmotrema hypotropum* by affecting thallus temperature and water potential”, *Mycologia*, **100**(4), 565–576.
- Anatole, P.C., Guru, S.K., Bathelemy, N., Jeanne, N., Bhushan, S., Murayama, T., Saxena, A.K. (2013), “Ethylacetate fraction of *Garcinae punctata* induces apoptosis in human promyelocytic cells (HL-60) through the ROS generation and G0/G1 cell cycle arrest: A bioassay-guided approach”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **36**, 865-874.
- Abid-Essefi, S., Zaied, C., Bouaziz, C., Ben Salem, I., Kaderi, R., Bacha, H. (2012), “Protective effect of aqueous extract of *Allium sativum* against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress”, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **64**, 689–695.
- Bačkorova, M., Bačkor, M., Mikeš, J., Jendželovský, R., Fedorčko, 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.
- Bačkorova, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J., Fedorčko, P. (2012), “Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines”, *Toxicology in Vitro*, **26**, 462–468.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Dévéhat, F. L., Boustie, J. (2003), “Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines”, *Phytomedicine*, **10**, 499–503.

- Bleau, A.M., Freire, J., Pajares, M.J., Zudaire, I., Anton, I., Nistal-Villán, E., Redrado, M., Zanduetta, C., Garmendia, I., Ajona, D., Blanco, D., Pio, R., Lecanda, F., Calvo, A., Montuenga, L.M. (2014), “New syngeneic inflammatory-related lung cancer metastatic model harboring double KRAS/WWOX alterations”, *Int. J. Cancer*, **135**, 2516-2527
- 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 Med*, **75**, 607–613.
- Butler, M. (2004), *Animal Cell Culture and Technology*, BIOS Scientific Publishers, New York, **2**, 32-33.
- Cabral, J.P. (2003), “Copper toxicity to five *Parmelia* lichens in vitro”, *Environmental and Experimental Botany*, **49**, 237-250.
- Candan, M., Yılmaz, M., Tay, T., Erden, M., Özdemir Türk, A. (2007), “Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Parmelia sulcata* and its Salazinic Acid Constituent”, *Z. Naturforsch.*, **62c**, 619-621.
- Chen, J., Blume, H.P., Beyer, L. (2000), “Weathering of rocks induced by lichen colonization— a review”, *Catena*, **39**, 121–146.
- Chi, A.S., Wen, P.Y. (2011), “Inhibiting angiogenesis in malignant gliomas”, *Handbook of Clinical Neurology* (Ed: W. Grisold and R. Soffietti), Neuro-oncology, **104 (3)**, chapter 19, 279-308.
- Chooi, Y.H., Stalker, D.M., Davis, M.A., Fujii, I., Elix, J.A., Louwhoff, S.H.J.J., Lawrie, A.C. (2008), “Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen *Xanthoparmelia semiviris*”, *Mycological research*, **112**, 147-161.
- Devehat, F.L., Tomasi, S., Elix, J.A., Bernard, A., Rouaud, I., Uriac, P., Boustie, J. (2007), “Stictic Acid Derivatives from the Lichen *Usnea articulata* and Their Antioxidant Activities”, *J. Nat. Prod.*, **70**, 1218-1220.

- Dragovich, P.S., Fauber, B.P., Boggs, J., Chen, J., Corson, L.B., Ding, C.Z., Eigenbrot, C., Ge, H., Giannetti, A.M., Hunsaker, T., Labadie, S., Li, C., Liu, Y., Ma, S., Malek, S., Peterson, D., Pitts, K.E., Purkey, H.E., Robarge, K., Salphati, L., Sideris, S., Ultsch, M., VanderPorten, E., Wang, J., Wei, B., Xu, Q., Yen, I., Yue, Q., Zhang, H., Zhang, X., Zhou, A. (2014), "Identification of substituted 3-hydroxy-2-mercaptocyclohex-2-enones as potent inhibitors of human lactate dehydrogenase", *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **24**, 3764–3771.
- El-Seedi, R.H., Burman, R., Mansour, A., Turki, Z., Boulos, L., Gullbo, J., Göransson, U. (2013), "The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: Discovery of an active cardiac glycoside from *Urginea maritima*", *Journal of Ethnopharmacology*, **145**, 746–757.
- Fazio, A., Bertoni, M.D., Adler, M.T., Ruiz, L.B., Rosso, M.L., Muggia, L., Hager, A., Wörgötter, E.S., Maier, M.S. (2009), "Culture studies on the mycobiont isolated from *Parmotrema reticulatum* (Taylor) Choisy: metabolite production under different conditions", *Mycol Progress*, **8**, 359–365.
- Fitzgerald, R.T., Wright, S.M., Samant, R.S., Kumar, M., Ramakrishnaiah, R.H., Hemert, R.V., Brown, A.T., Angtuaco, E.J. (2014), "Elevation of serum lactate dehydrogenase at posterior reversible encephalopathy syndrome onset in chemotherapy-treated cancer patients", *Journal of Clinical Neuroscience*, **2**, 1575–1578.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006), "In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride", *Toxicology Letters*, **160**, 171–177.

- García-Caballero, M., Marí-Beffa, M., Cañedo, L., Medina, M.A., Quesada, A.R. (2013), “Toluquinol, a marine fungus metabolite, is a new angiosuppresor that interferes the Akt pathway”, *Biochemical Pharmacology*, **85**, 1727–1740.
- Geyikoğlu, F., Türkeş, H., Aslan, A. (2007), “The protective roles of some lichen species on colloidal bismuth subcitrate genotoxicity”, *Toxicology and Industrial Health*, **7**, 487–492.
- Güllüce, A., Aslan, A., Sökmen, M., Şahin, F., Adıgüzel, A. (2006), “Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*”, *Phytomedicine*, **13**, 515–521.
- Güner, A., *İn vitro Şartlarda Kadmiyumun Oluşturduğu Genetik ve Oksidatif Hasara Karşı Dermatocarpon intestiniforme (liken) Ekstrelerinin Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2011.
- Güvenç, A., Küpeli Akkol, E., Süntar, İ., Keleş, H., Yıldız, S., Çalış, İ. (2012), “Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds”, *Journal of Ethnopharmacology*, **144**, 726–734.
- Holst, C.M., Oredsson, S.M. (2005), “Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines”, *Toxicology in Vitro*, **19(3)**, 379–387.
- Honda, N.K., Pavan, F.R., Coelho, R.G., Leite, S.R.A., Micheletti, A.C., Lopes, T.I.B., Misutsu, M.Y., Beatriz, A., Blum, R.L., Leite, C.Q.F. (2010), “Antimycobacterial activity of lichen substancens”, *Phytomedicine*, **17**, 328–332.

- Ingólfssdóttir, K., Chung, G.A.C., Skúlason, V.G., Gissurarson, S.R., Vilhelmsdóttir, M. (1998), “Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **6(2)**, 141-144.
- Ingólfssdóttir, K., Lee, S.K., Bhat, K.P.L., Lee, K., Chai, H.B., Kristinsson, H., Song, L.L., Gills, J., Gudmundsdóttir, J.T., Greenwood, E.M., Jang, M.S., Pezzuto, J.M. (2000), “Evaluation of Selected Lichens From Iceland for Cancer Chemopreventive and Cytotoxic Activity”, *Pharmaceutical Biology*, **38(4)**, 313–317.
- Jeon, J.S., Chung, S., Kamm, R.D. (2013), “Microfluidic Platforms for Evaluating Angiogenesis and Vasculogenesis”, *Microfluidic Cell Culture Systems* (Ed: Bettinger, C., Borenstein, J.T., Tao, S.L.), A volume in Micri and Nano Technologies, 385-403.
- Jiang, Z., Wu, M., Miao, J., Duan, H., Zhang, S., Chen, M., Sun, L., Wang, Y., Zhang, X., Zhu, X., Zhang, L. (2013), “Deoxypodophyllotoxin exerts both anti-angiogenic and vascular disrupting effects”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **45**, 1710– 1719.
- Karabulut, G., *Bazı Liken Ekstrelerinin Çeşitli Bitki Fungal Hastalıkları Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Kobashigawa, L.C., Xu, Y.C., Padbury, J.F., Tseng, Y.T., Yano, N. (2014), “Metformin Protects Cardiomyocyte from Doxorubicin Induced Cytotoxicity through an AMP-Activated Protein Kinase Dependent Signaling Pathway: An In Vitro Study”, *Plos One*, **9**, Issue 8 DOI:10.1371/journal.pone.0104888.
- Kohlhardt-Floehr, C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J., Truscott, 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**, 97-102.

- Koparal, A.T., Ulus, G., Zeytinoğlu, M., Tay, T., Özdemir Türk, A. (2010), “Angiogenesis Inhibition by A Lichen Compound Olivetoric Acid”, *Phytother. Res.*, **24(5)**, 754-758.
- Liu, J.G., Zhao, H.J., Liu, Y.J., Wang, X.L. (2010), “Effect of selenium-enriched malt on VEGF and several relevant angiogenic cytokines in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma rats”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **24**, 52—57.
- Liu, W., Li, L., Li, W. (2014), “Gene co-expression analysis identifies common modules related to prognosis and drug resistance in cancer cell lines”, *Int. J. Cancer*, **135**, 2795–2803
- Lucia, U. (2013), “Thermodynamics and cancer stationary states”, *Physica A: Statistical Mechanics and its applications*, **392**, 3648-3653.
- Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P., Stanojković, T. (2012a), “Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites”, *Phytomedicine*, **19**, 1166-1172.
- Manojlović, N.T., Vasiljević, P.J., Maskovic, P.Z. (2012b), “Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **22(2)**, 291-298.
- Marti-Centelles, R., Cejudo-Marin, R., Falomir, E., Murga, J., Carda, M., Marco, J.A. (2013), “Inhibition of VEGF expression in cancer cells and endothelial cell differentiation by synthetic stilbene derivatives”, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, **21**, 3010-3015.
- Melo, M.G.D., Santos, J.P.A., Serafini, M.S., Caregnato, F.F., Pasquali, M.A.B., Rabelo, T.K., Rocha, R.F., Quintans Jr., L., Araújo, A.S.A., Amaral de Silva, F., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P. (2011), “Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, lichen secondary metabolite”, *Toxicology in Vitro*, **25(2)**, 462-468.

- Mosmann, T. (1983), “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55-63.
- Özdemir Türk, A., Candan, M., Elix, J.A. (2007), “*Xanthoparmelia isidiovagans* (Parmeliaceae), a New Lichen Record for Turkey”, *Turk J Bot*, **31**, 159-160.
- Pallela, R., Na-Young, Y., Kim, S.K. (2010), “Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms”, *Marine Drugs*, **8**, 1189-1202.
- Pavlovic, V., Stojanovic, I., Jadranin, M., Vajs, V., Djordjević, I., Smelcerovic, A., Stojanovic G. (2013), Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes, *Food and Chemical Toxicology*, **51**, 160–164.
- Paz, G.A., Raggio, J., Gómez-Serranillos, M.P., Palomino, O.M., González-Burgos, E., Carretero, M.E., Crespo, A. (2010), “HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp.”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **53**, 165–171.
- Perry, N.B., Benn, M.H., Brennan, N.J., Burgess, E.J, Ellis, G., Galloway, D.J., Lorimer, S.D., Tangney, R.S. (1999), “Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxic Activity Of New Zealand Lichens”, *Lichenologist*, **31(6)**, 627–636.
- Pöykkö, H., Bačkor, M., Bencúrová, E., Molcanová, V., Bačkorová, M., Hyvärinen, M. (2010), “Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites”, *Oecologia*, **164**, 423–430.
- Pund, S., Borade, G., Rasve, G. (2014), “Improvement of anti-inflammatory and anti-angiogenic activity of berberine by novel rapid dissolving nanoemulsifying technique”, *Phytomedicine*, **21(3)**, 307-314.

- Ranković, B., Mišić, M., Sukdolak, S. (2008), “The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Phycia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*”, *World J Microbiol Biotechnol*, **24**, 1239–1242.
- Ranković, B., Kosanić, M., Manojlović, N., Rančić, A., Stanojković, T. (2014), “Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites”, *Med Chem Res.*, **23**, 408–416.
- Ren, M.R., Hur, J.S., Kim, J.Y., Park, K.W., Park, S.C., Seong, C.N., Jeong, I.Y., Byun, M.W., Lee, M.K., Seo, K.I. (2009), “Anti-proliferative effects of *Lethariella zahlbruckneri* extracts in human HT-29 human colon cancer cells”, *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2157–2162.
- Risler, T., Basan, M. (2013), “Morphological instabilities of stratified epithelia: a mechanical instability in tumour formation”, *New Journal of Physics*, **15**, 065011.
- Romero, N.R., Agostinis, P. (2014), “Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Autophagy Pathways by Reactive Oxygen Species and their Relevance in Cancer Progression and Therapy”, *Autopagy* (Ed: Hayat M.A.), Academic Press, USA, Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Autophagy Pathways, 159–178.
- Senthilkumar, S., Venkatesan, J., Manivasagan, P., Kim, S.K. (2013), “Antiangiogenic effects of marine sponge derived compounds on cancer”, *Enviromental Toxicology and Pharmacology*, **36**, 1097-1108.
- Shawky, N.M., Shehatou, G.S.G., Rahim, M.A., Suddek, G.M., Gameil, N.M. (2014), “Levocetirizine ameliorates high fructose diet-induced insulin resistance, vascular dysfunction and hepatic steatosis in rats”, *European Journal of Pharmacology*, **740**, 353-363.
- Shrestha, G., St. Clair, L.L. (2013), “Lichens: a promising soure of antibiotic and anticancer drugs” *Phytochem. Rev.*, **12**, 229-244.

- Song, Y., Dai, F., Zhai, D., Dong, Y., Zhang, J., Lu, B., Lou, 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.
- Stark, S., Hyvärinen, M. (2003), "Are phenolics leaching from the lichen *Cladina stellaris* sources of energy rather than allelopathic agents for soil microorganisms?", *Soil Biology & Biochemistry*, **35**, 1381–1385.
- Sun, C., Zhang, Y., Xue, X., Cehng, Y., Liu, H., Zhao, C., Lou, H., Qu, X. (2011), "Inhibiton of angiogenesis involves in anticancer activity of riccardin D, macrocyclic bisbibenzyl, in human carcinoma", *European Journal of Pharmacology*, **667**, 136-143.
- Tan, İ., *Bazı Ağır Metal ve Organik Kirleticilerin Laktat Dehidrogenaz Enzimi Üzerindeki Engelleyici Etkilerinin Belirlenmesi ve Enzim İnhibisyonuna Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 2008.
- Tokiwno, T., Satoh, H., Obara, T., Hirota, H., Yoshizawa, Y., Yamamoto, Y. (2009), "A lichens substence as an antiproliferative compouns against HL-60 human leukemia cells: 16-O-Acetyl-leucotylic acid isolated from *Myelochroa aurulenta*", *Biosci. Biohechnol. Biochem.*, **73(11)**, 2525-2527.
- Touy, R.M. (2004), "Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress", *Primer on the Autonomic Nervous System* (Ed: Robertson, D., Biaggioni, L., Burnstock, G., Low, P., Paton, J.F.R.), Academic Press, Chapter 69, 335-338.
- Türk, H., Yılmaz, M., Tay, T., Özdemir Türk, A., Kıvanç, M. (2006), "Antimicrobial Activity of Extracts of Chemical Races of the Lichen *Pseudevernia furfuracea* and their Physodic Acid, Chloroatranorin, Atranorin and Olivetoric Acid Constituents, *Z Naturforsch*, **C 61**, 499–507.

- Ulus, G., *Bazı bitki ekstrelerinin sıçan endotel hücreleri üzerine etkisinin in vitro araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2006.
- Valarmathi, R., Hariharan, G.N., Venkataraman, G., Parida, A. (2009), “Characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from lichen *Dirinaria applanata*”, *Phytochemistry*, **70**, 721–729.
- Wang, G., Ge, S., Shen, Y., Wang, H., Dong, Q., Zhang, Q., Geo, J., Wang, Y. (2012), “Study on the biodegradability and biocompatibility of WE magnesium alloys”, *Materials Science and Engineering C*, **32**, 2190-2198.
- Wang, X., Chen, Z., Tong, L., Tan, S., Zhou, W., Peng, T., Han, K., Ding, J., Xie, H., Xu, Y. (2013), “Naphthalimides exhibit *in vitro* antiproliferative and antiangiogenic activities by inhibiting both topoisomerase II (topo II) and receptor tyrosine kinases (RTKs)”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **65**, 477-486.
- Washington, T.A., Healey, J.M., Thompson, R.W., Lowe, L.L., Carson, J.A. (2014), “Lactate dehydrogenase regulation in aged skeletal muscle: Regulation by anabolic steroids and functional overload”, *Experimental Gerontology*, **57**, 66-74.
- Whipple, C.A., Korc, M. (2011), “Angiogenesis Signaling Pathways as Targets in Cancer Therapy”, *Handbook of Cell Signaling* (Ed: Bradshaw, R.A., Dennis, E.A.), Disease Pathophysiology: Translation Implications, Academic Press, USA, **3(2)**, chapter 333.
- Wu, L., Ma, C., Ge, L., Kong, Q., Yan, M., Ge, S., Yu, J. (2015), “Paper-based electrochemiluminescence origami cyto-device for multiple cancer cells detection using porous AuPd alloy as catalytically promoted nanolabels”, *Biosensors and Bioelectronics*, **63**, 450–457.
- Yılmaz, M., Özdemir Türk, A., Tay, T., Kıvanç, M. (2004), “The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cladonia foliacea* and Its (-)-Usnic Acid, Atranorin, and Fumarprotocetraric Acid Constituents”, *Z. Naturforsch.*, **59c**, 249-254.

- Yousuf, S., Choudhary, M. I., Rahman, A. (2014), “Lichens: Chemistry and Biological Activities”, *Studies in Natural Products Chemistry* (Ed: Rahman A.), Vol. **43**, 223-256.
- Yurdakök, B., *Türkiye’de yetişen Eryngium kotschy (boğadiken) ve Eryngium maritimum (Deniz boğadiken) bitkilerinin sitotoksik etkilerinin Hep2, HepG2, VERO ve U138 MG hücre kültürlerinde araştırılması*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.
- Zeytinoğlu, H., Incesu, Z., Ayaz Tüylü, B., Özdemir Türk, A., Barutca, B. (2008), “Determination of Genotoxic, Antigenotoxic and Cytotoxic Potential of the Extract from Lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. in Vitro”, *Phytother. Res.*, 22, 118–123.
- Zhu, Q., Zhang, N.Q., Lau, C.F., Chao, J., Sun, Z., Chang, R.C., Chen, F., Wang, M. (2012), “In vitro attenuation of acrolein-induced toxicity by phloretin, a phenolic compound from apple”, *Food Chemistry*, **135**, 1762-1768.
- Ziech, D., Anastopoulos, I., Hanafi, R., Voulgaridou, G.P., Franco, R., Georgakilas, A.G., Pappa, A., Panayiotidis, M.I. (2012), “Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention”, *Cancer Letters*, **327**, 16–25.