

**MEME KANSERİNDE USNİK ASİTİN İNFLAMASYON ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Metin YILDIRIM

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ECZACILIK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI**

MERSİN

ARALIK-2019

**MEME KANSERİNDE USNİK ASİTİN İNFLAMASYON ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Metin YILDIRIM

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ECZACILIK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI**

Danışman

Prof. Dr. Serap YALIN

İkinci Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ

MERSİN

ARALIK -2019

ONAY

Metin YILDIRIM tarafından Prof. Dr. Serap YALIN danışmanlığında ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ ikinci danışmanlığında hazırlanan “Meme Kanserinde Üsnik Asitin İnflamasyon Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 17 Aralık 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Serap YALIN	
Üye	Prof.Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU	
Üye	Prof.Dr. Ali Erdinç YALIN	
Üye	Prof.Dr. Rezan HATUNGİL	
Üye	Prof.Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.12.2019 tarih ve 2019/579 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgelerin akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversiteden başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' Works.
- I used all of the referred Works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

Tarih/ Date

17 Aralık 2019 /17 December 2019

İmza/ Signature

Metin YILDIRIM

ÖZET

MEME KANSERİNDE USNİK ASİTİN İNFLAMASYON ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanılan kanser türüdür. İnflamasyonun kanseri tetiklediği bilinmektedir. İnflamasyon, aktive olmuş inflamatuvar faktörlerin veya immün hücrelerin aracılık ettiği vücudun birçok bölgesinde gerçekleşen bir süreçtir. Bu süreç gerçekleşirken makrofajlar ve monositler inflamasyonun akut faz cevabının kaskadında önemli görevlere sahiptirler. Stimüle edildiklerinde tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin 1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi sitokin ve enzimler üretilmektedir. Böylece inflamasyon gelişiminde önemli genlerden olan COX-2 ve iNOS'un hedeflenmesi kanserin erken teşhisinin yanı sıra tedavide yeni stratejilerin geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Usnik asit antibiyotik olarak bilinmesinin yanı sıra antiviral, antiinflamatuvar, antiproliferatif etki gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu çalışmada, usnik asitin MCF-7 hücre hattında COX-2 ve iNOS genlerinin ekspresyonuna ek olarak bu genlerin son ürünleri olan prostaglandin E2 (PGE₂), nitrik oksit (NO) düzeyleri ayrıca TNF- α ve IL-6 sitokin seviyeleri üzerine etkisi incelenmiştir. Hücreler 6 gruba ayrılmıştır. Hiçbir uygulama yapılmayan grup kontrol olarak kabul edilmiştir. Usnik asitin MCF-7 hücrelerinde LD₅₀ düzeyi xCELLigence sistemi ile 15,638 μ M olarak belirlenmiştir. 48 saatlik usnik asit uygulamasından sonra çalışma gruplarında COX-2, iNOS gen ekspresyonu Real time PCR ile TNF- α , IL-6, NO, PGE₂ düzeyleri ise ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarımıza göre, usnik asit COX-2 ve iNOS gen ekspresyon seviyesini ve NO, PGE₂ düzeyini, aynı zamanda TNF- α , IL-6 seviyeleri doza bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir. (p<0,05). Bulgularımıza göre, usnik asitin MCF-7 hücre hattında sitotoksik ve antiinflamatuvar role sahip olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: antiinflamatuvar, COX-2, prostaglandin, indüklenabilir nitrik oksit sentaz, sitokin, meme kanseri, MCF-7

Danışman: Prof. Dr. Serap YALIN, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF USNIC ACID ON INFLAMMATION IN BREAST CANCER

Breast cancer is the most common type of cancer among women. Inflammation is known to trigger cancer. Inflammation is a process that occurs in many parts of the body mediated by activated inflammatory factors or immune cells. While this process is taking place, macrophages and monocytes have important roles in the cascade of the acute phase response of inflammation. Cytokines and enzymes such as tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) are produced when stimulated. Thus, targeting of COX-2 and iNOS, which are important genes in the development of inflammation, is important for the early detection of cancer as well as the development of new strategies in treatment. Usnic acid is known as antibiotic as well as antiviral, anti-inflammatory, antiproliferative effect has many biological activities. In this study, the effect of usnic acid on the expression of COX-2 and iNOS genes in MCF-7 cell line, as well as the end products of these genes, PGE₂, NO levels and TNF- α , IL-6 cytokine levels were investigated. Cells were divided 6 groups. The group of cells with no treatment was considered as the control group. LD₅₀ of usnic acid value was determined 15.638 μ M by xCELLigence system in MCF-7 cells. After 48 hours of usnic acid administration, COX-2, iNOS gene expression was measured by Real-time PCR and TNF- α , IL-6, NO, PGE₂ levels were measured by ELISA method. Our study showed that usnic acid was decreased gene expression levels of COX-2 and iNOS and NO, PGE₂ in the meantime cytokines (TNF- α , IL-6) levels in dose depended manner. According to our findings, usnic acid may have cytotoxic and antiinflammatory role in MCF-7 cell line.

Keyword: anti-inflammatory, COX-2, prostaglandin, iNOS, cytokine, breast cancer, MCF-7

Advisor: Prof. Dr. Serap YALIN, Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yedi yıl önce beni Biyokimya Anabilim Dalına kabul ederek, o günden bugüne yetişmemde emeğini geçen, bilgi birikimini, zamanını, sabrını ve şefkatini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Serap YALIN'a sonsuz teşekkürü borç bilirim. Değerli bilgileriyle destek veren 2. Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ'e. Manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Prof. Dr. A. Erdiç YALIN'a, Prof. Dr. Necmiye CANACANKATAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Z. Nil DOĞRUER ÜNAL'a ve Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na,

Hayatta elde ettiği deneyimleri bana aktaran bunun yanı sıra manevi olarak birçok durumda bana abilik yapan Dr. Bio. Ulaş DEĞİRMENCİ'ye, akademik yolda beraber ilerlediğim Uzm. Kim. Merih AKKAPULU'ya. Akademik yaşantımda desteğini esirgemeyen ve bana sabreden sevgili Eşim Falak Lara YILDIRIM'a.

Hayatta benden sadece okumamı bekleyen hayallerimi gerçekleştirmemde destek olan, özlemi bir dakika bile kalbimde azalmayan Sevgili Babam Erhan YILDIRIM'a,

Çalışmalarına verdiği desteklerden dolayı Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve tez çalışmama 2018-2-TP3-2957 numaralı proje ile verdiği destekten dolayı Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Son olarak benim ben olmamı sağlayan, hayata bakışımı tamamen değiştiren bana babalık hissini yaşatan kalbimin ve ruhumun sahibi sevgili kızım Anna Meryem YILDIRIM'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Kanser	3
2.2. Meme Kanseri	3
2.3. Meme Kanserinin Nedenleri	4
2.4. Kanser Gelişimindeki Genetik Modeller	5
2.5. Risk Faktörleri ve Risk Tahminleri	6
2.5.1. Yaş	6
2.5.2. Aile Öyküsü	6
2.5.3. Genetik Yatkınlık	6
2.5.4. Erken Menarş	6
2.5.5. Emzirme	7
2.5.6. Testosteron	7
2.5.7. Fiziksel Aktivite	7
2.5.8. Obezite	7
2.5.9. Radyasyon	8
2.6. Teşhis	8
2.7. Meme Kanseri İçin Tarama ve Görüntüleme	8
2.8. Meme Kanseri Tipleri	11
2.8.1. İnvasiv Karsinoma	11
2.8.2. Non-İnvasiv Meme Kanseri	11
2.8.3. Duktal Karsinoma <i>in situ</i>	11
2.8.4. Lobular Karsinoma <i>in situ</i>	12
2.8.5. Meme Başı Paget Hastalığı	12
2.8.6. İnflamatuvar Meme Kanseri	13
2.9. Meme Kanseri ile Mücadele	13
2.9.1. Cerrahi Müdahale	13
2.9.2. Radyoterapi	14
2.9.3. Kemoterapi	14
2.9.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Doğal Ürünler	14
2.10. İnflamasyon ve Meme Kanseri	16
2.11. Siklooksijenaz 2 (COX-2) Yapısı ve Fonksiyonu	17
2.11.1. COX-2'nin Karsinogenezdeki Mekanizması	17
2.11.2. Meme Kanserinde Tedavi ve Önlenmesi Stratejilerinde COX'un Yeri	17
2.12. Prostaglandin E ₂	18
2.12.1. Prostaglandin E ₂ 'nin Pro-İnflamatuvar Aktivitesi	19
2.12.2. Prostaglandin E ₂ 'nin Kanserdeki Rolü	20
2.13. Nitrik Oksit (NO)	20
2.13.1. NO'nin Kanserdeki Çeşitli Aktiviteleri	22
2.13.2. NO ve Hormonların Meme Kanseri ile İlişkisi	22

	Sayfa
2.13.3. iNOS ve NO	22
2.13.4. iNOS Geni ve Düzenlenmesi	23
2.13.5. Farmakolojik Yaklaşım	24
2.13.6. NO'in İnflamasyon ile İlişkisi	25
2.14. Likenler	25
2.14.1. Usnik Asitin Kimyasal Yapısı ve Biyosentezi	27
2.14.2. Usnik Asit İçeren Likenlerin Medikal Kullanımı	29
2.14.3. Antioksidan ve Pro-Oksidan Aktiviteleri	30
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Kimyasal Madde ve Çözücüler	31
3.1.2. Alet, Gereç ve Cihazlar	31
3.1.3. Kullanılan Kitler	32
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı	32
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Usnik Asitin Hazırlanışı	32
3.2.2. Hücre Kültürü Ortamı	32
3.2.3. Hücre Pasajlama	32
3.2.4. Hücrelerin Sayımı	32
3.2.5. Hücrelere Madde Uygulaması ve Sitotoksinite Testi	32
3.2.6. Hücrelere Usnik Asit Uygulaması	35
3.2.7. mRNA İzolasyonu	35
3.2.8. cDNA İzolasyonu	35
3.2.9. Gen Ekspresyon Ölçümü	36
3.2.10. Hücrelerde PGE ₂ Düzey Ölçümü	37
3.2.11. NO Ölçümü	38
3.2.12. Hücrelerde TNF- α Düzeyi Ölçümü	38
3.2.13. Hücrelerde IL-6 Düzeyi Ölçümü	39
3.3. İstatistiksel Yöntemler	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1. Gen Ekspresyonu, ELISA ve NO Bulguları	41
4.1. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in iNOS Gen Ekspresyonuna Etkileri	41
4.2. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in COX-2 Gen Ekspresyonuna Etkileri	42
4.3. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in PGE ₂ Seviyesi Üzerine Etkileri	43
4.4. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in NO Seviyesi Üzerine Etkisi	44
4.5. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in TNF- α Seviyesi Üzerine Etkisi	45
4.6. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in IL-6 Seviyesi Üzerine Etkisi	46
4.2. Tartışma	47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. cDNA Sentezi için Oluşturulan Reaksiyon Karışımı	36
Tablo 3.2. İnkübasyon aşamaları	36
Tablo 3.3. Gen Ekspresyonu Ölçümü için Hazırlanan Reaksiyon Karışımı	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Dünya genelinde kadınlarda meme kanseri görülme oranı	4
Şekil 2.2. Genetik değişime neden olan internal ve eksternal ajanlar	5
Şekil 2.3. Elle meme muayenesi	9
Şekil 2.4. Mamografi	10
Şekil 2.5. Memenin manyetik rezonans görüntülenmesi (MRI)	10
Şekil 2.6. Duktal karsinoma in situ	11
Şekil 2.7. İnvaziv duktal karsinoma	12
Şekil 2.8. Meme kanserinde çeşitli cerrahi uygulamalar	13
Şekil 2.9. Meme kanserinde doğal bileşiklerin moleküler hedefleri	15
Şekil 2.10. PG biyosentez yolağı	19
Şekil 2.11. NO'nin biyosentezi ve mekanizması	20
Şekil 2.12. NO'nin çeşitli yollarla üzerine etkileri	21
Şekil 2.13. iNOS düzenlenmesinde transkripsiyon faktörü NF κ B'nin rolü	24
Şekil 2.14. <i>Cladonia Portentosa</i> bitkisi	26
Şekil 2.15. <i>Usnia Barbata</i> Bitkisi	26
Şekil 2.16. <i>Alectoria</i> Bitkisi	27
Şekil 2.17. Usnik Asit'in Yapısı	27
Şekil 2.18. Usnik Asit'in Enantiyomer Yapısı	28
Şekil 2.19. Usnik Asit'in Sentez Şeması	29
Şekil 3.1. Hücrelerin xCELLigence plakalarına eklenmesi	34
Şekil 3.2. xCELLigence sistemi	34
Şekil 4.1. iNOS gen ekspresyonu düzeyleri	41
Şekil 4.2. COX-2 gen ekspresyonu düzeyleri	42
Şekil 4.3. Grupların PGE ₂ seviyeleri	44
Şekil 4.4. Grupların NO seviyeleri	45
Şekil 4.5. Grupların TNF- α seviyeleri	46
Şekil 4.6. Grupların IL-6 seviyeleri	47

KISALTMALAR VE SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
AA	Araşidonik Asit
BKI	Vücut Kitle İndeksi
cPGES	Sitozolik Prostaglandin E Sentaz
COX	Siklooksijenaz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2
HMG CoA	3-Hidroksil 3-Metil Glutaril Koenzim A
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlökin-10
iNOS	İndüklenebilir NO Sentaz
IFN γ	İnterferon gama
MDA	Malondialdehit
mPGES-1	Mikrozomal Prostaglandin E Sentaz-1
MIR	Memenin Manyetik Rezonans Görüntülenmesi
PLA ₂	Fosfolipaz A ₂
LOX	Lipoksijenaz
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
mRNA	Mesajcı Ribonükleotik Asit
NF- κ B	Nükleer Faktör- Kappa B
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NSAID	Steroid Olmayan Anti İnflamatuvar İlaçlar
p53	Tümör Protein 53
PG _{2a}	Prostaglandin 2a
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PTEN	Fosfatidil ve Tensin Homoloğu
SOD	Süperoksit Dismutaz
TGF-B1	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TXA ₂	Tromboksan A ₂
VEGF	Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlar arasında en çok ölüme neden olan kanser türüdür. Yapılan araştırmalara göre gelişmiş ülkelerde her 7 kadından birinde meme kanseri görüldüğü, bununla birlikte Türkiye’de meme kanseri görülme sıklığının son 20 yılda 2 kattan daha fazla arttığı bildirilmiştir. Meme kanseri tedavisinde son yıllarda birçok gelişme kaydedilmiştir. Birçok biyolojik yaklaşımda, meme kanseri ve alt gruplarının daha iyi anlaşılmasının yanı sıra daha etkili tedavi ve gen ekspresyon profillemesi hedeflenmiştir.

Likenler mantarlar ve fotosentetik alglerden meydana gelen simbiyotik birlikteliklerdir ve asırlardır medikal amaçla kullanılmaktadırlar. Birçok likenin antibakteriyal aktivite göstermesi sebebiyle likenlerden elde edilen ekstraktlar veya etkin maddeler klinikte antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Bu etkin maddelerden biri olan usnik asit antibiyotik olarak bilinmesinin yanı sıra antiviral, antiinflamatuvar, antiproliferatif etki gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Buna rağmen usnik asit’in antiinflamatuvar aktivitesi ve mekanizması üzerine çalışmalar kısıtlıdır.

İnflamasyon; fiziksel ve iskemik hasar, enfeksiyon, toksinlere maruziyet, kimyasal iritasyon ya da diğer travma tiplerine cevap olarak doku hasarı ile sonuçlanan fizyolojik bir süreçtir ve aktive olmuş inflamatuvar faktörlerin veya immün hücrelerin aracılık ettiği vücudun birçok bölgesinde gerçekleşir. Bu süreç gerçekleşirken makrofajlar ve monositler inflamasyonun akut faz cevabının kaskadında önemli görevlere sahiptirler. Stimüle edildiklerinde tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi sitokin ve enzimler üretilmektedir. Pro-inflamatuvarın yanı sıra anti-inflamatuvar sitokinlerin ve mediyatörlerin aktivasyonu inflamatuvar reaksiyonların anahtar basamağıdır. Nitrik oksit (NO), iNOS tarafından sentezlenmekte ve vasküler düz kasların gevşemesinde, merkezi sinir sisteminde nörotransmitter, konak hücre savunması, vazodilatasyon, trombosit yapışmasının engellenmesi gibi çeşitli etkileri bulunmaktadır. NO’nın aşırı üretimi çeşitli inflamatuvar hastalıklara neden olmaktadır. Nükleer faktör kappa B (NF- κ B), apoptoz, tümör oluşumu ve çeşitli otoimmün hastalıklar ve inflamasyonda kritik rol oynayan IL-1, IL-6, TNF- α ve iNOS dahil olmak üzere çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle, bu faktörlerin baskılanması, inflamatuvar reaksiyon ve hastalıkların önlenmesi için etkili bir terapötik strateji olabilir.

İnflamatuvar hastalıklar birçok kanser türünün gelişiminde rol oynarken, bazı steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar meme gibi çeşitli kanser türlerinin oluşum riskini azaltmaktadır. İnflamasyonun tümör gelişiminin 3 aşaması (başlama, gelişme ve metastaz) ile

ilişkili olduğu bilinmektedir. Sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve çeşitli genler kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bu proteinler inflamatuvar süreçten önce ve inflamatuvar süreç boyunca ifade edilmekte ve hastalığın çeşitli aşamalarında spesifik kanser belirteci olabileceği düşünülmektedir. Sitokinlerin kompleks ağının yanı sıra iNOS, COX-2 genleri ve bu genlerin ürünleri prostaglandin E₂ (PGE₂) ve NO ölçümlerinin kanser gelişimini takip etmenin yanı sıra bu hastalığın tedavisinde yenilikçi sistemlerin gelişmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. 2017 yılında yapmış olduğumuz literatür taramasında meme kanserinde usnik asitin inflamasyon üzerine etkileriyle ilgili çalışma bulunmadığından bu çalışmayı planladık. Usnik asitin meme kanserinde meydana gelen inflamasyonu baskılayıp baskılamayacağı konusuna katkıda bulunacağı düşünülmektedir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Kanser

Kanser tanımı, MÖ (460-370) yıllarında ünlü fizikçi olan ve aynı zamanda tıbbın babası olarak kabul gören Hipokrat tarafından yapılmıştır.

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın yapmış olduğu tanıma göre vücudun çeşitli bölgelerinde hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan 100'den fazla hastalık gurubudur. Birbirinden farklı kanser tipleri olmasına rağmen, bu hastalığın başlama süreci hücrelerin kontrol dışı anormal şekilde büyümesine dayanmaktadır [1].

Sağlıklı hücreler, bölünme yetenekleri sayesinde yenilenecek ölen hücrelerin yerini doldurmakta ve bunun sayesinde doku hasarının önlenmesinde rol almaktadır. Bu bölünme ve çoğalma işlemi DNA vasıtasıyla kontrol edilmekte ve düzenlenmektedir. DNA'da meydana gelen bir kısım hasar sonrasında hücreler kontrolsüzce bölünmeye ve çoğalmaya başlamaktadır. Kontrolsüzce çoğalan bu hücreler tümörleri meydana getirmekte ve bu tümörler iyi huylu ve kötü huylu olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Kötü huylu tümörler, büyüdükçe sağlıklı dokulara zarar vermekte ve kanser hastalığı ortaya çıkmaktadır. Bazen kanser hücreleri meydana geldikleri dokudan kan ve lenf dolaşımı vasıtasıyla başka dokularda bu hastalığın taşınmasına sebep olmakta ve bu olaya metastaz adı verilmektedir [2].

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığının verilerine göre ülkemizde her yıl 174 bin kişi kansere yakalanmaktadır. Bunların % 40'ını kadınlar oluştururken % 60'ını erkekler oluşturmaktadır. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen kanser tipi meme, akciğer, rahim, bağırsak ve tiroid kanseri iken; erkelerde akciğer, mesane, bağırsak, mide ve prostat kanseri olarak bilinmektedir [1].

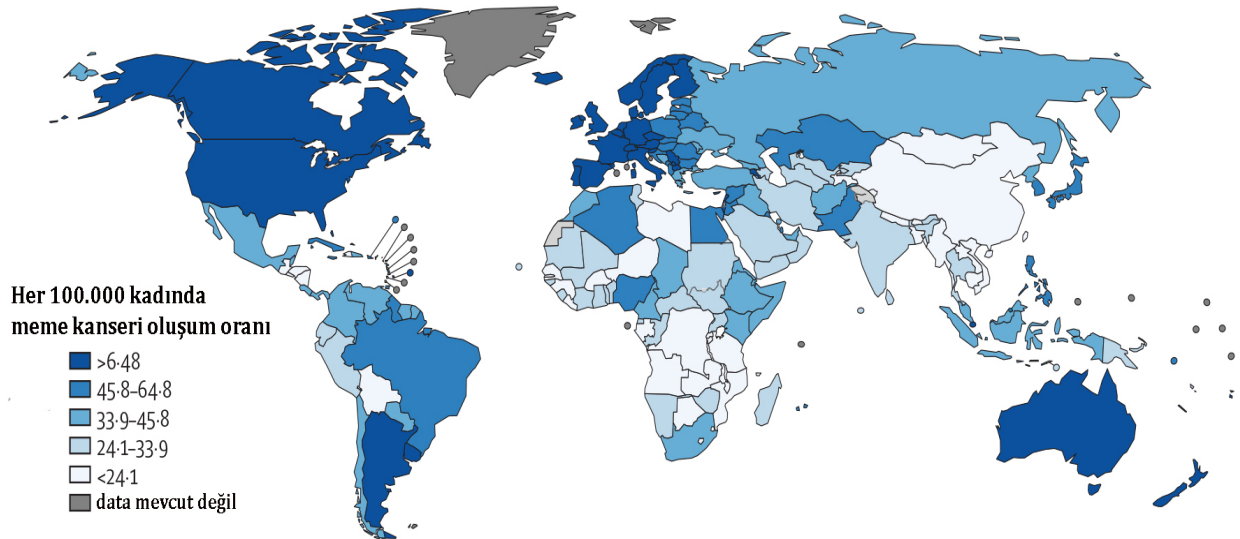
2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri dünya genelindeki kadınlarda en sık görülen kanser türü (yeni kanser vakalarının % 22'si) olmakla beraber, kanser nedeni ölümünün en fazla olduğu (kansere nedeniyle ölenlerin % 14'ü) türüdür. Her yıl 2,1 milyon kadın meme kanserinden etkilenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2018 verilerine göre 627.000 kadın meme kanseri nedeniyle ölmüştür. Bu durum kadınlarda kanser nedeni ile ölümünün % 15'ni kapsamaktadır [3]. Meme kanserli bireylerde erken teşhis hayati önem taşımaktadır. Meme kanserinin belirlenmesi için iki farklı strateji mevcuttur. Bunlar erken teşhis ve görüntülemedir. Zayıf sağlık sistemleri ve sınırlı kaynaklara sahip kadınlarda meme kanseri geç evrelerde teşhis edildiğinden dolayı erken belirti ve semptomların farkındalığına dayanan erken tanı programlarına öncelik verilmeli ve tedaviye

hemen sevk edilmelidir [4]. Dünya genelinde kadınlarda meme kanseri görülme oranı Şekil 2.1.'de verilmiştir [5].

Meme kanseri belirtileri;

- Göğüs veya koltuk altı bölgesinde ele gelen şişlik,
- Meme başından akıntı gelmesi,
- Meme başında şekil bozukluğu, çökme ve renk değişimi,
- Meme başında egzama benzeri deri döküntüleri ve soyulmalar,
- Meme ucunda kızarıklık ve yara oluşumu,
- Kilo kaybı,
- Meme ağrısı,
- Halsizlik ve çabuk yorulma, şeklindedir [4].



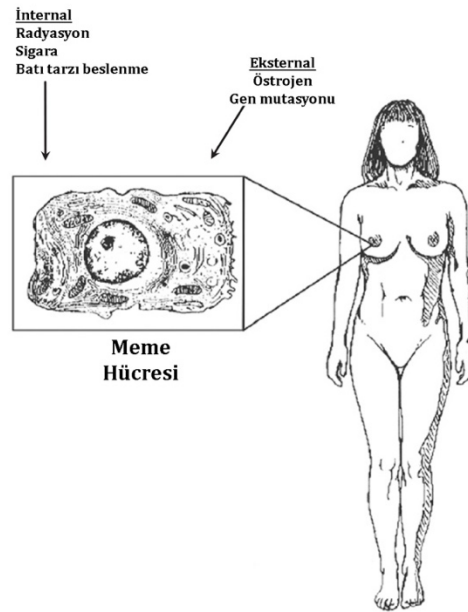
Şekil 2.1. Dünya genelinde kadınlarda meme kanseri görülme oranı [5].

2.3. Meme Kanserin Nedenleri

Meme kanserinin nedeni sadece etiyoloji ile açıklanamaz. Meme kanseri, yıllar boyunca memedeki hücrelerin maruz kaldığı hasarın birikimi sonucunda görülebilmektedir. Genellikle iki tip moleküler travma kanserin oluşumunu sağlayabilir. Bunlar DNA'nın mutasyonu sonucunda hücre proliferasyonunun tetiklenmesi diğeri ise hücre büyümesini, ölümü, farklılaşması, kromozomal replikasyondan sorumlu olan ve DNA'yı meydana getiren kritik genlerin mutasyonu ile meydana gelmektedir [6-8].

2.4. Kanser Gelişimindeki Genetik Modeller

Kanser gelişimindeki genetik model, normal olan meme hücrelerinin dönüşümünü temel almaktadır. İnternal ve eksternal faktörler tarafından genetik değişimler indüklenmekte ve bu teoriye göre bütün meme kanserlerinin patogenezi genetik temele dayanmaktadır. Böylece mutasyonlar, proliferasyonun ve hücre ölümünün indüklenmesi gibi hücresel hasarlar meme kanserine neden olmaktadır [6]. İnternal ve eksternal ajanlar genetik değişime neden olmaktadır. Eksternal ajanlar, batı tarzı beslenme, radyasyon, sigara iken internal ajanlar ise, östrojen ve genetik mutasyonlardır (Şekil 2.2). Meme kanserinin internal sebepleri çeşitli intraselüler ve ekstraselüler süreçlere bağlıdır. Meme kanserinde ekstraselüler faktör olarak östrojen bilinmektedir. Kadınların yaşamındaki yüksek miktarda östrojen maruziyetinin meme kanseri için önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir [9]. Erken menarş, geç menopoz ve çocuk sahibi olmama meme kanseri için risk arttırıcı faktörlerdir [10]. Östrojen, östrojen reseptörü yoluyla meme hücrelerinin çoğalmasına neden olmaktadır. İnterselüler süreç ile ilişkili olarak, bu süreçte her hücre bölünmesi sırasında meydana gelen DNA sentezinde oluşan hatalardan ileri gelmektedir. Bazen tümör başlamasına ve gelişmesine neden olan kritik genlerde mutasyona sebebiyet vermektedir. Meme kanseri gelişimindeki bireysel en büyük risk aileden geçen mutasyonlu genlerdir [11].



Şekil 2.2. Genetik değişime neden olan internal ve eksternal ajanlar [12].

2.5. Risk Faktörleri ve Risk Tahminleri

Yaş, kişinin veya ailesinin göğüs hastalıkları ile ilgili geçmişi, çevresel faktörler ve genetik yatkınlık, erken menarş, hormon, obezite, radyasyon kadınlarda meme kanseri oluşumunda risk faktörü olduğu bilinmektedir [13].

2.5.1. Yaş

Meme kanseri görülmesinde yaş oldukça önemli bir faktördür. Yaş artışı ile birlikte görülme sıklığı artar. 45-49 yaş aralığında pik yapmaktadır. [14].

2.5.2. Aile öyküsü

Yakın akrabalarında meme kanseri öyküsü bulunan kadınlarda bu hastalığın meydana gelme ihtimali daha yüksektir. Meme kanseri hastalığına sahip kadınların % 15'nin yakın akrabalarında meme kanseri mevcuttur [15].

2.5.3. Genetik yatkınlık

Yaklaşık % 20-25 oranında meme kanseri hastası pozitif aile öyküsüne sahipken, sadece % 5-10 meme kanser vakası otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Genetik yatkınlıkla ilgili alleller belirlenmiştir. Bunlar BRCA 1/2, p53, PTEN veya diğer genetik mutasyonlardır. BRCA1, BRCA2 ve TP53 mutasyonları Li-Fraumeni sendromuna, PTEN Cowden sendromuna, STK11 ise Peutz-Jegher sendromuna neden olmaktadır. Genetik yatkınlığa bağlı meme kanseri sendromlarının yarısı BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları ile ilişkilidir [16].

2.5.4. Erken menarş

Erken yaştaki menarş meme kanseri risk faktörlerinden biridir. Menarşdaki iki yıllık gecikme risk oranını % 10 düşürmektedir. Yapılan bir çalışmada, erken yaşta menarş (≤ 13 yaş) olan kadınlarda hormon reseptör pozitif tümör riskinin iki kat arttığı bildirilmiştir [17].

2.5.5. Emzirme

Yapılan çalışmalara göre, emzirme meme kanseri gelişimine karşı koruyucu etki göstermektedir. Emzirme ovulasyon döngüsünün düzene girmesini erteleyebilir ve endojen seks hormonlarının seviyelerini azaltabilmektedir [18].

2.5.6. Testosteron

Premenopoz ve postmenopoz dönemlerdeki kadınlarda endojen seks hormonlarının yüksek seviyeleri meme kanseri için risk oluşturmaktadır. Postmenopoz dönemindeki kadınların dolaşımdaki testosteron düzeylerinin yüksek olması meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir [19].

2.5.7. Fiziksel aktivite

Fiziksel aktivitenin meme kanseri riski üzerine etkileri incelendiğinde, orta şiddetli aktivitenin riski % 2 azalttığı belirtilirken yüksek şiddetli aktivitenin bu riski % 5 azalttığı belirtilmiştir [20].

2.5.8. Obezite

Obezitenin özellikle postmenopoz dönemdeki kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığı belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada fazla kilolu (BKI 25-29) ve obez kadınlar (BKI> 30.0) ile normal kilo aralığında olan kadınlar karşılaştırıldığında, meme kanseri olma riskinin % 28 arttığı bildirilmiştir [21]. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi kardiyovasküler hastalık, diyabet ve obezite ile ilişkilidir. İnsülin, hücrel metabolizma üzerine anabolik etki göstermekte ve insan kanser hücrelerinde insülin reseptör geninin yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir [22]. Hiperinsülinemi, postmenopoz döneminde diyabet tanısı konulmamış kadınlarda meme kanseri için bağımsız bir risk faktörü olarak belirlenmiş ve bu bilgi obezite ile meme kanseri arasındaki ilişkinin açıklanmasına yardımcı olabileceği düşünülmüştür [23].

2.5.9. Radyasyon

Medikal tedavi sırasında çeşitli kaynaklardan gelen radyasyon ve nükleer maruziyet meme kanseri riskini arttırmaktadır [24]. Çocukluk döneminde radyasyon tedavisi gören hastalarda radyasyonun dozuyla korele olarak meme kanseri olma riski artmaktadır [25]. Hiroşima ve Nagasaki nükleer bomba saldırıları sonrasında Japon kadınlarda radyasyonla ilişkili olarak meme kanserinin arttığı belirtilmiştir [26]. Çernobil faciası sonrasında ise genç yaşlarda radyasyona maruz kalan Belarus ve Ukraynalı kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı artmıştır [27].

2.6. Teşhis

Meme muayenesi, mamografi, meme ultrasonu ve (manyetik rezonans görüntülenmesi) MRI sadece meme kanserinin teşhisinde kullanılmaktadır. Memede normal olmayan bir yumru alanı ultrason veya MRI ile incelenmektedir. Ancak bir sonraki tanı için en önemli adım histolojik açıdan belirlenmesidir. Primer tanı diğer görüntüleme sistemleri ile yapılsa bile, meme kanseri ultrason ile % 80-90 oranında belirlenebilmektedir. Kor biyopsi, histolojik tanının konunmasına yardımcı olmaktadır. İnvazif duktal, invazif lob meme kanserinin yanı sıra HER2, progesteron ve östrojen reseptörü durumunu belirlememizi sağlamaktadır [28].

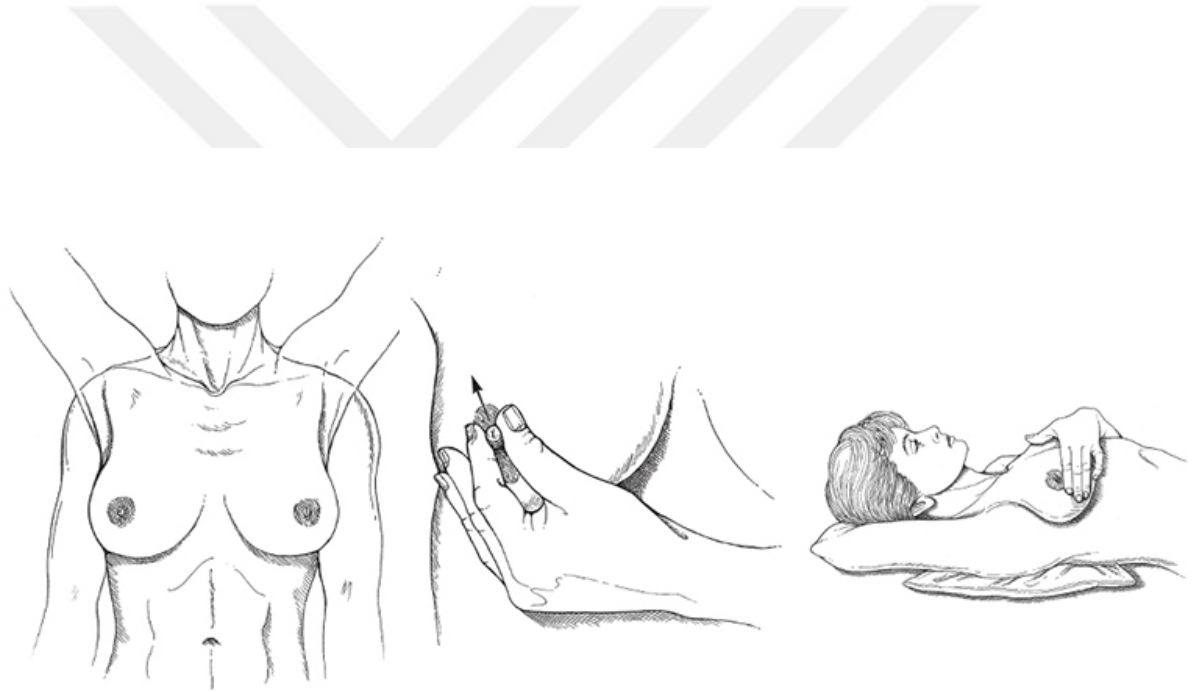
2.7. Meme Kanseri İçin Tarama ve Görüntüleme

Meme kanseri tedavisinde başarılı bir tedavinin anahtarı erken teşhistir. T1 tümörlerine (2 cm'den daha az) sahip hastaların 10 yıl yaşamda kalım oranı % 85 iken, T3 tümörüne sahip geç tanı konulmuş hastalarda 10 yıl yaşamda kalım oranı % 60'dır [29]. Meme kanserinin belirlenmesinde 4 temel teşhis prosedür öncülük etmektedir. Bunlar;

- 1- Klinik tetkik,
- 2- Mamografi,
- 3- Meme ultrasonu,
- 4- MRI dır.

Bunlar arasında klinik tetkik en pratik olanıdır. Meme büyüklüğüne ve bölgeye göre tümör 1 ile 2 cm arasında veya daha büyüktür. Gün geçtikçe bu tetkik metodu yaygın hale gelmektedir. Bu yöntem bu hastalığın tanısı ve tedavisi için oldukça önemlidir. Kadınların bu konuda bilinçlendirilmesi ve düzenli olarak kendi başlarına günlük tetkiklerini gerçekleştirmeleri

gerekmektedir (Şekil 2.3.) [30]. Erken teşhis ve sistemik görüntülemenin yanı sıra mamografi meme kanserinin teşhisinde çok büyük bir öneme sahiptir. Uygulamanın kolaylığı, tekniksel hazırlığın kolay olması, basit olarak standardize edilmesi, daha önceki mamografiler ile doğrudan karşılaştırılması mamografinin en önemli avantajlarından biridir. Gelişmiş ülkelerde, meme kanseri ölüm oranını düşürmek için 50-70 yaş arasındaki kadınlara her 2 senede bir sistemik mamografi görüntülemesi yapılmaktadır (Şekil 2.4.). Meme ultrasonu, meme kanserinin yönetilmesinde oldukça önemli bir araçtır. MRI ve mamografi ile görüntülenemeyen çoğu meme kanseri ultrason ile de görüntülenebilir. Ancak ultrasonun başarısı çeşitli parametrelere bağlıdır. Bunlar; memenin boyutu, doku yoğunluğu, daha önceki cerrahi ve radyasyon müdahaleleridir. Birçok radyolog tarafından tercih edilen en hassas ve en pahalı yöntem görüntüleme sistemi MRI'dır (Şekil 2.5) [31].



Şekil 2.3. Elle meme muaynesi [12].



Şekil 2.4. Mamografi [32]



Şekil 2.5. Memenin manyetik rezonans görüntülenmesi (MRI) [33].

2.8. Meme Kanseri Tipleri

2.8.1. İnvaziv Karsinoma

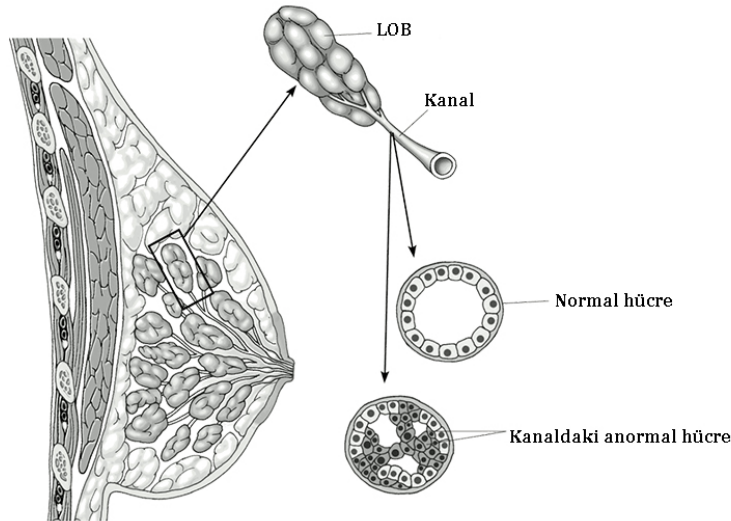
Kanser türlerinin yaklaşık olarak %75-80'i invaziv karsinomadır. Kanser hücrelerinin invaziv özelliği, biyolojik olarak son derece önemlidir ve bu hücrelere, çevresindeki lenfatik ve vasküler kanallara nüfuz etme yeteneği vermektedir. Lenfatik ve vasküler kanallara penetrasyon bölgesel lenf bezleri veya uzak organlara tümör metastazı ile sonuçlanabildiği için klinik açıdan önemlidir [34].

2.8.2. Non-İnvaziv Meme Kanseri

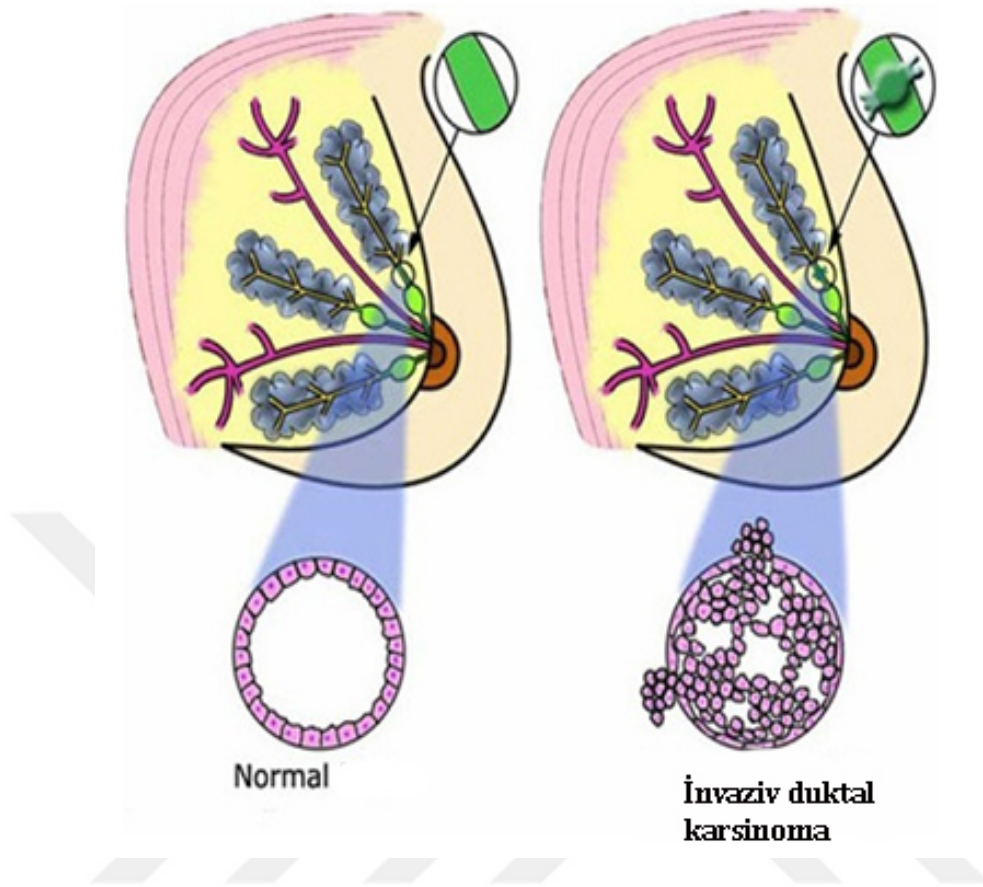
Non-invaziv meme kanseri hücreleri, meme kanalları bölgeleri ile sınırlanmış olup, memenin yağ ile çevreli dokuları ve buna bağlı olarak da dokulara yayılmamaktadır. Duktal karsinoma *in situ* non- invaziv meme kanser formudur [34].

2.8.3. Duktal Karsinoma *in situ*

Duktal karsinoma *in situ*, invaziv olmayan meme kanser türleri arasında en sıklıkla görülen memenin duktal bölgesinde meydana gelen kanser türü olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.6.). Bu tanıya sahip bireylerde invaziv meme kanseri olma ihtimali 5 kat artmıştır (Şekil 2.7.). Mamografi sonucu incelendiğinde amorf mikrokalsifikasyon kümeleri mevcut bulunmuştur [34].



Şekil 2.6. Duktal karsinoma *in situ* [35].



Şekil 2.7. İnvaziv duktal karsinoma [34].

2.8.4. Lobular karsinoma *in situ*

Lobular karsinoma *in situ*, *in situ* terimi kanserin başladığı ve geliştiği bölgeden yayılmadığı anlamına gelmektedir. Bu kanser türünde memenin süt bezleri içerisindeki hücre sayısı oldukça artmaktadır. Mamografi ile tanı koyulamaz. Ancak şans eseri biyopsi sonrasında farkına varılabilmektedir [34].

2.8.5. Meme Başı Paget Hastalığı

İngiliz cerrah James Paget ile anılan bu hastalık meme başı ve areola'da bulunan kanser tipidir. Ciltte kitle yoktur ancak egzama bulguları mevcuttur. Biyopsi ile tanı koyulmaktadır. Bu hastalığın patolojisinde büyük, soluk, vakuollü paget hücreleri mevcuttur [36].

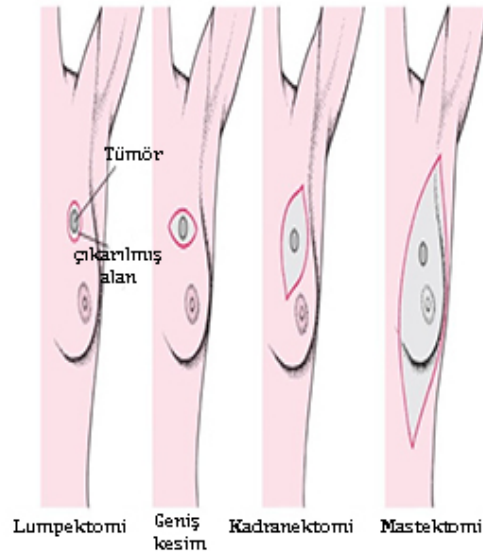
2.8.6. İnflamatuvar Meme Kanseri

Bu meme kanseri türü, tüm invaziv meme kanseri türleri arasında % 1 ile % 3 arası sıklıkla görülmekle birlikte, tahmini en zor olan ve çok hızlı gelişen türüdür. Memenin bulunduğu cilt dokusunda kızarıklık mevcuttur, lenf kanalları ve damarları kanserli hücreler tarafından tıkanmıştır. Mamografi ile tanı konulmaz biyopsi yapılması gerekmektedir [34].

2.9. Meme Kanseri ile Mücadele

2.9.1. Cerrahi Müdahale

Tümörün tipine ve aşamasına göre lumpektomi ya da mastektomi işlemi gerçekleştirilir. Standart uygulama dokunun çıkarılmasından sonra bölgede herhangi bir kanserli bölge bulunmamasını sağlamaktır, aksi takdirde kanserin tamamen temizlenmesi için daha çok doku çıkarılması gerekmektedir. Son zamanlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu moda haline gelmiştir. Bu metod sayesinde uzaktaki lenf nodu temizlenirken bile yan etkiler oldukça azdır. Lumpektomi: Kanserli olmayan dokunun etrafından çok az doku alınarak yapılır. Kadranektomi: Memenin 4'te 1'i alınır. Mastektomi de ise; memenin tamamı alınır (Şekil 2.8) [34].



Şekil 2.8. Meme kanserinde çeşitli cerrahi uygulamalar (34).

2.9.2. Radyoterapi

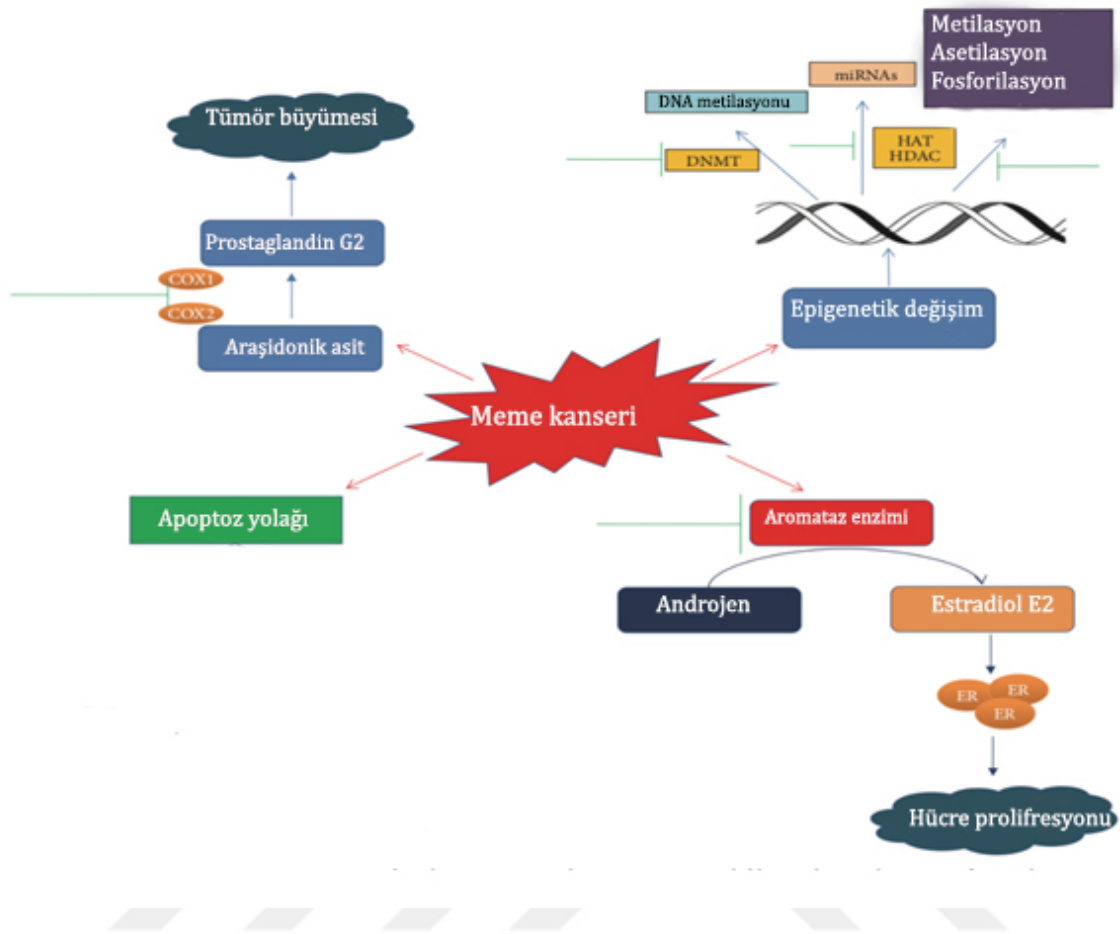
Radyoterapi, yüksek enerjili X-ışınları ya da gama ışınlarının tümörün hedeflenmesi veya cerrahi müdahale sonrası tümör bölgesine uygulanması işlemidir. Bu radyasyon cerrahi müdahale sonrasında kalmış veya tekrarlamış tümörlerin öldürülmesinde oldukça efektif bir yöntemdir. Meme kanserinde uygulanan radyoterapi genellikle cerrahi müdahaleden sonra uygulanmakta ve memenin korunmasında uygulanan tedavinin ayrılmaz bir parçasıdır. Radyoterapinin kanserli hücreyi temizlemesi için dozunun yeterince kuvvetli olması gerekmektedir. Genellikle bu tedavi 5 ile 7 hafta arasında, haftada 5 gün uygulanmaktadır. Her tedavi yaklaşık olarak 15 dakika sürmektedir [37].

2.9.3. Kemoterapi

Kemoterapi, kanserli hücrelerin elimine edilmesinde kullanılan ilaç tedavisi olarak tanımlanmaktadır. Meme kanserinde kullanılan ilaç tedavisi genel sağlığa, hastanın klinik geçmişine, yaşına, kanserin türü ve evresine, çeşitli tedavilere olan toleransına bağlıdır. Kemoterapi genellikle bir döngü şeklinde yapılır. Bu döngüler, belirli bir tedavi dönemi ve bunu takiben toparlanma süresi ardından ikinci bir tedavi şeklinde yapılmaktadır. Kemoterapi bazen tümöre cerrahi müdahale yapmadan tümörün küçültülmesi için kullanılır [37].

2.9.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Doğal Ürünler

Uzun süredir, meme kanseri tedavisinde hormonal terapi, cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Birçok yan etkinin yanı sıra ilaçlara karşı direnç bu tedavilerin kullanılmasını etkisiz hale getirmektedir. Bunların yanına kullanılabilecek doğal kaynaklardan elde edilecek bileşik ve türevleri sayesinde bu sorunun ortadan kaldırılabileceği düşünülmektedir. Doğal bileşikler, agresif meme kanserine karşı savaşabilmekte, kanserli hücre proliferasyonunu azaltabilmekte ve kansere bağlı yolakları düzenleyebilmektedir. Meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek bitkisel kökenli yeni doğal ve diyet takviye bileşiklerini üzerine birçok çalışma yapılmaktadır [38]. Çeşitli bitkisel kaynaklı etkin maddelerin meme kanseri gelişiminde önemli role sahip epigenetik modifikasyonlar, aromataz aktivitesi, arşidonik asit yolağı, apoptoz yolağı, NF- κ B yolağı üzerine çalışmaları yapılmaktadır. Bu fitokimyasallar tedavi sırasında meydana gelen yan etkileri azaltmalarının yanı sıra anksiyete ve oluşabilecek stresle mücadelede yardımcı olabilmektedirler. Birçok çalışmaya göre meme kanserinin tedavisinde bitkilerden elde edilen doğal bileşikler etkili sonuç vermiştir [39].



Şekil 2.9. Meme kanserinde doğal bileşiklerin moleküler hedefleri [39].

Meme kanserinde, DNA hipermetilasyonu ile birlikte histon asetilasyonu ya da metilasyonu anormal histon modifikasyonu genomik stabilizasyonun bozulması ve tümör baskılayıcı genlerin susturulması ile ilişkilidir [40,41]. Doğada bulunan doğal fitokimyasallar ve ikincil metabolitler epigenetik olayları düzenlemektedirler. Bununla birlikte epigenetik bozuklukların kanseri tetiklemeden önce düzeltilmesinde rol almaktadırlar. Fitokimyasallar spesifik anahtar transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek kinazlar ve büyüme faktörü reseptörleri yollarını düzenler. Apoptozun başlatılması, tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktivasyonu, hücre döngüsünün bloklanması üzerine çeşitli etkileri mevcuttur (Şekil 2.9.) [42,43]. Chlebowski ve arkadaşlarının yapmış olduğu klinik bir çalışmada eksemestan, anastrozole'unda içinde bulunduğu çeşitli aromataz inhibitörleri ve tamoksifenin kemopreventif etkisini incelemişlerdir [44]. Bu ilaçlar çok etkili olmasına rağmen, örneğin tamoksifenin endometrial kanseri riskini arttırması gibi çeşitli yan etkilere sahiptirler. Sentetik ilaçlara kıyasla doğal bileşikler meme kanseri kemopreventif olma konusunda daha çok umut vaatetmektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalara göre daha az toksisite ve yan etki gösterdikleri bildirilmiştir [45]. Sitokrom p450 enzim ailesinin üyesi ve membrana bağlı aromataz enzimi, androstenedionu estron'a (E1),

testosteronu ise estradiol'e dönüştürür ve östrojenin biyosentezinde önemli role sahiptir. Bir çok çalışmaya göre fitokimyasallar östrojene benzer kimyasal yapı göstermekte ve aromataz aktivitesini inhibe edebilmektedirler [46]. Buna ek olarak bitkisel kaynaklı ürünler araşidonik asit (AA), sikloksijenaz enzimi (COX), fosfolipaz A₂'ler (PLA₂) ve lipoksijenazları (LOX) hedefleyerek kemopreventif etki gösterirler [47]. Kurkumin, likopen, apigenin gibi bir çok fitokimyasal prostaglandin ve lökotrien gibi metabolik ürünlerin biyosentezini inhibe ederler ve böylece bu bileşiklerin meme kanserinin kemopreventasyonunda teröpatik ajan olabileceği düşünülmektedir. *In vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalara göre fitokimyasalların malign ve premalign hücrelerde apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Apoptoz, embriyonik gelişim ve doku homeostazı için çok önemli rol oynayan programlanmış hücre ölümü anlamına gelmekte ve disregülasyonu tümör oluşumuna hatta kanser hücresi ilaç direncinin gelişmesine neden olabilmektedir [48].

2.10. İnflamasyon ve Meme Kanseri

Kanser ve inflamasyon arasındaki ilişki 1863 yılında Rudolf Ludwig Carl Virchow tarafından kurulmuştur [49]. Tümör gelişimini normal olmayan inflamasyon gelişim süreci olarak tanımlamıştır [50]. Doku hasarının tedavisinde kimyasal sinyal ağlarını kullanarak venöz sistemden hasar alanına doğru lökositlerin alımı ve infiltrasyonu sağlanır ve tedavi süreci başlatılır. Hücre proliferasyonu ve doku tedavisine ek olarak inflamasyon ölü dokuların ve diğer yabancı maddelerin temizlenmesinden sorumludur. Bu tarz inflamatuvar cevap sınırlıdır ve onarım tamamlandıktan sonra kendini durdurur [51]. Ancak inflamasyon düzenlenmez ise kronik hale gelir, proliferatif epitelin DNA'sı ile etkileşime giren ve kalıcı genomik değişikliklerle sonuçlanan, reaktif oksijen ve azot türlerinin yanı sıra büyüme faktörlerinin sürekli üretimi nedeniyle dokuda malign tümör oluşumuna ve büyümesine neden olabilir. İnflamasyon tümör gelişiminde ve metastazda rol alır. Sitokinlerin, kemokinlerin, prostaglandinlerin, serbest radikallerin, büyüme faktörünün, proteolitik enzimlerin içinde yer aldığı birçok inflamatuvar mediyatör tümör gelişimini stimüle edebilir. Bu faktörler bazen kanserli hücreler tarafından bazen ise tümör mikroaleminde mevcut olan makrofaj, nötrofil, lenfosit, dendritik hücreler tarafından üretilir. Bu faktörlerden bazıları doğrudan kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve ölümünü engellerken, onkogenik mutasyonlara neden olabilir. Diğerleri ise protümörjenik aktivite gösterebilir [52,53]. Epidemiyolojik çalışmalar tüm kanserlerin %20'sinin kronik inflamatuvar hastalıkların sonucunda ortaya çıktığını göstermiştir. İnflamasyonun önlenmesi veya azaltılması kanserin kontrolünde önem arz etmektedir [54,55].

2.11. Siklooksijenaz 2 (COX-2) Yapısı ve fonksiyonu

İnsan COX ailesi 3 izoenzimden oluşmaktadır. Bunlar: COX-1, COX-2 ve son zamanlarda keşfedilen COX-3'tür. COX-1 ve COX-2 prostanoid biyosentezinde ilk iki basamakla ilişkilidir. Hücre membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A2, C ya da D tarafından salınan araşidonik asit, dihomog γ -linolenik asit gibi doymamış yağ asitlerinden metabolik dönüşümünü kataliz ederler. COX enzimi araşidonik asiti 15-Hidroperoksid-PGG₂'e çevirir ve PGG₂ nin PGH₂' ye indirgenmesi prosesinde görev almaktadır. COX-1 ve COX-2 homodimerik, hem grubu içeren glikolize proteinlerdir. COX-1 ve COX-2 farklı kromozomlarda lokalize ve birbiri ile sıkı ilişki içerisinde bulunan genler tarafından kodlanır.

COX-1 geni, tüm dokularda eksprese olmaktadır. Housekeeping gen olarak hücre döngüsü boyunca eksprese edilmektedir. Bu nedenle konstitütif izoenzim olarak adlandırılmıştır. COX-2, büyüme faktörüne, tümör promotörlerine, hormonlara, sitokin ve strese karşı hızlıca indüklenmektedir. COX-2 invaziv duktal ve lobüler karsinomada eksprese olmaktadır [56].

2.11.1. COX-2'nin Karsinogenezdeki Mekanizması

COX-2 ekspresyonu postranskripsiyon, transkripsiyon seviyeleri, protein sentezi ve degradasyon oranı tarafından düzenlenmektedir. İnsan COX-2 geni, IL-6, cAMP gibi çoklu transkripsiyon faktör bölgesine sahiptir. Habis tümörün oluşturduğu kimyasal ortam COX-2 transkripsiyonu için idealdir. Disregüle onkogenler, sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar COX-2 ekspresyonunu indüklerler. Bunun yanında tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon fonksiyonunu kaybetmesi COX-2'nin aşırı ekprese edilmesine neden olmaktadır. Birçok tümör baskılayıcı genin fonksiyonunu kaybetmesi de COX-2'nin aşırı ekspresyonu ile açıklanabilmektedir [57-62].

2.11.2. Meme Kanserinin Tedavisi ve Önlenmesi Stratejilerinde COX'un Yeri

Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID) seçimli veya seçimsiz olarak COX'u baskılayabilmektedirler. Birçok çalışma NSAID'lerin meme kanseri riskini azalttığını göstermiştir. Son çalışmalara göre NSAID kullanan bireylerde meme kanseri riskinin % 24 azaldığı gösterilmiştir [63].

2.12. Prostaglandin E₂ (PGE₂)

PGE₂, inflamasyon ve kanserle ilişkili çok çeşitli biyolojik etkileri ortaya çıkarabilen biyolojik olarak aktif bir lipittir. PGE₂, yaygın olarak membran fosfolipidleri içinde bulunan 20-karbon esansiyel yağ asitlerinin oksidasyonu ile üretilen eikosanoidlerin bir alt sınıfı olan prostanoid lipid ailesine aittir. Prostaglandinlerin sentezi 3 aşamada gerçekleşmektedir;

1. Membran fosfolipidlerinden yağ asitlerinin oluşması
2. Serbest yağ asitlerinin siklooksijenazlarla siklik endoperoksidlere oksidlenmesi
3. Prostanoid türünün oluşması

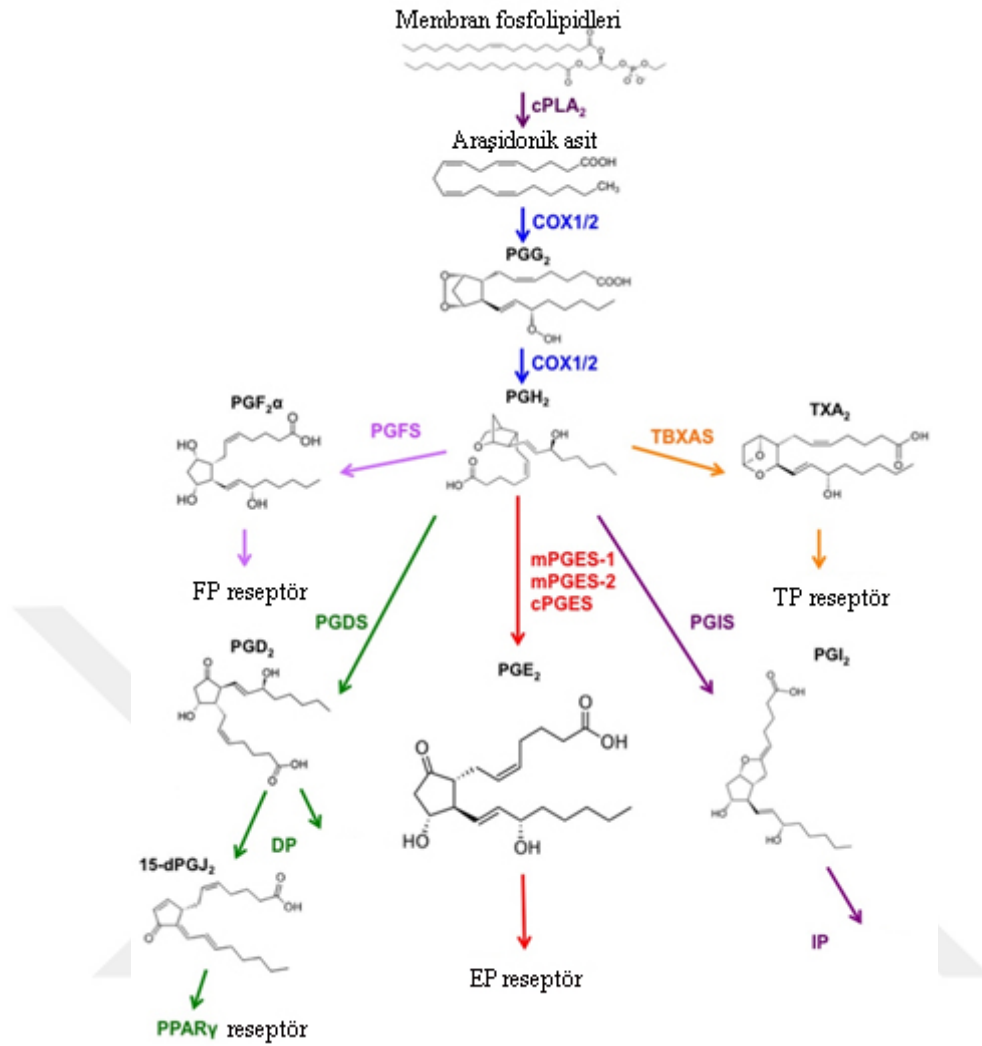
PGE₂, Prostaglandin E_{2α} (PGF_{2α}), Prostaglandin D₂ (PGD₂), Prostaglandin I₂ (PGI₂) ve tromboksan A₂ (TXA₂) dahil prostanoidler, oldukça spesifik enzimler ile çeşitli basamaklar sonucunda sentezlenir.

Prostaglandinlerin sentezi, membran fosfolipidlerinin hidrolozi fosfolipaz a₂(PLA₂)'ler ile başlar.

Serbest yağ asitlerinin fosfolipidlerden oluşumu 2 yolak ile meydana gelir.

1. Fosfolipaz A₂ yolağı
2. Fosfolipaz C yolağı

Memelilerde fosfolipidler sonucunda meydana gelen ve eikozanoidlerin prekürsörü olan 3 farklı yağ asidi mevcuttur bunlar; AA, 5,8,11,14,17-eikozapentaenoik asit, 8,11,14-eikozatrienoik asit dir. Membranla salınan AA, ilk önce PGG₂ ye daha sonra PGH₂ ye dönüşür, her iki aşama da COX enzimleri tarafından sırayla katalizlenir. COX burada hem siklooksijenaz hem peroksidaz aktivitesi gösterir. Üç farklı PGE sentaz PGE₂ sentezine katkıda bulunur. Bu terminal sentazlar, çeşitli koşullar altında sıkıca düzenlenen üç izoformdan oluşur ve mikrozomal PGE sentaz-1 (mPGES-1), mPGES-2 ve sitozolik PGE sentaz (cPGES) içerir. mPGES-1, PGE₂ seviyelerinde geçici bir yükselme meydana getirmek için çeşitli proinflamatuvar uyarıcılar tarafından COX-2 ile birlikte sıklıkla indüklenir. mPGES-2 ve cPGES temel PGE₂ seviyelerini korumak için eksprese olur ve işlevsel olarak COX-1 ile birlikte görev alır. mPGES-1, glutatyon (GSH) bağımlı olmasına rağmen, mPGES-2 ve cPGES biyosentetik aktiviteleri için kofaktöre gerek duymaz [64,65].



Şekil 2.10. PG biyosentez yolağı (65).

2.12.1. PGE₂ nin Pro-İnflamatuvar Aktivitesi

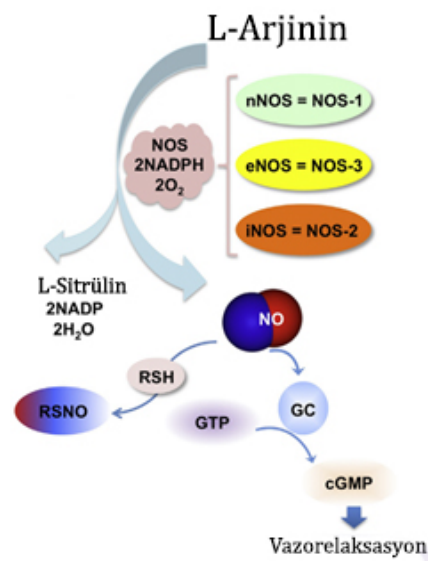
İnflamatuvar yanıtın ilk aşamasında, PGE₂ ve PGI₂ gibi prostanooidler, enfeksiyon, doku yaralanması, şişme ve ödem gibi durumlarda nötrofillerin, makrofajların ve mast hücrelerinin doku girişini kolaylaştırmak için vazodilatör olarak hareket ederler [66]. Buna ek olarak, PGE₂ ağrı yanıtını arttırmak için duyuşal sinirleri uyarır ve pirojenik etkileri arttırmak için preoptik alandaki nöronlara etki eder. PGE₂'nin inflamasyon üzerine olan etkisi mPGES geni knock out farelerde yapılmıştır [67].

2.12.2. PGE₂'nin Kanserdeki Rolü

Kanser bağlamında, PGE₂'nin genel olarak güçlü tümör teşvik edici aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir. Bu veri, deney hayvanı çalışmalarından elde edilen önemli kanıtların yanı sıra, NSAID'lerin kanser riski üzerindeki etkileri üzerine yıllarca süren klinik araştırmalara dayanmaktadır. Aspirin ve diğer NSAID'lerin tümör oluşumu üzerindeki koruyucu etkileri, büyük olasılıkla COX enzimlerinin inhibisyonu ve bunun sonucunda prostanoid metabolitlerin, özellikle de PGE₂'nin sentezinin azalmasından kaynaklıdır. Waddell ve Loughry yapmış olduğu çalışmada Gardner sendromu bulunan hastalarda sulindac tedavisinin poliplerin yok olmasına neden olduğunu bildirmişlerdir [68-70].

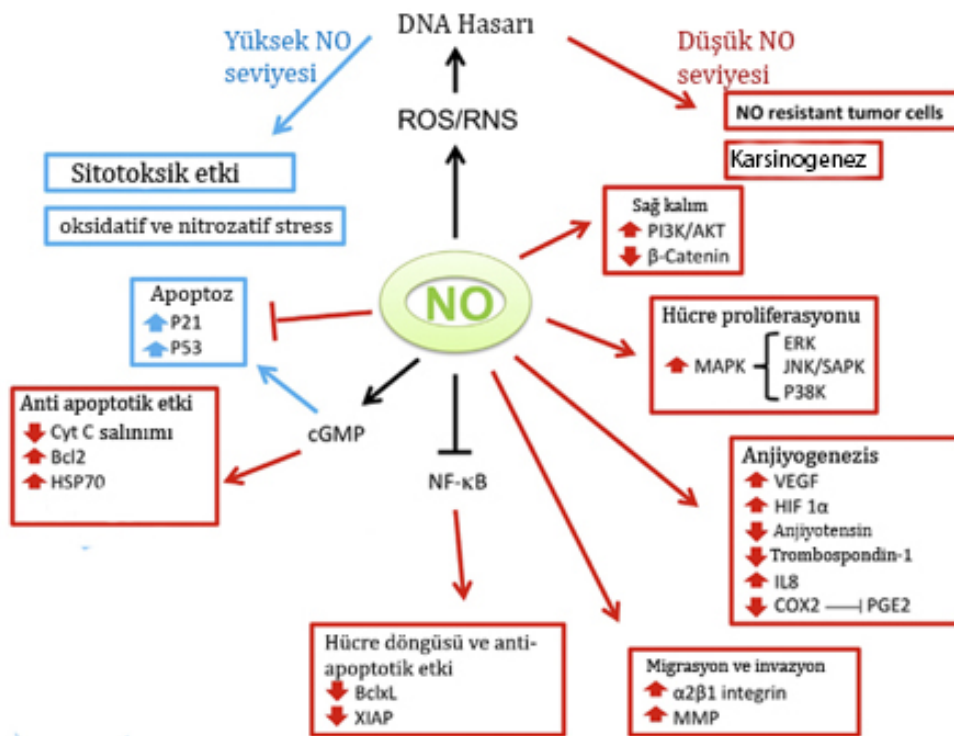
2.13. NO

NO, organizma tarafından sentezlenen vücutta birçok biyolojik aktivitesi olan serbest radikaldır. 1980'lerin sonunda ilk kez vazoaktif küçük molekül olarak tanımlandıktan sonra NO'nin kardiyovasküler aktivitesi daha çok vasküler relaksasyon özelliklerinin yanı sıra antitrombotik ve antiinflamatuvar etkisinden kaynaklıdır [71,72]. Kan akışını düzenlemesinin yanında, NO, anti patojenik cevap, immün cevap ve norotransmitter gibi çeşitli fizyolojik görevleri vardır. Normal fizyolojik şartlar altında, L-argininin L-sitruiline dönüşümü sırasında nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi varlığında NO üretilir [73-75]. NOS'in 3 izoformu mevcuttur. Bunlar nöronal NO sentaz (nNOS, NOS1 olarak ta bilinir), indüklenebilir NO sentaz (iNOS, NOS2) ve endotel NO sentaz (eNOS, NOS3)'dır (Şekil 2.11.) [76].



Şekil 2.11. NO'nin biyosentezi ve mekanizması (77).

cNOS ailesine ait eNOS ve nNOS aktive edildiklerinde dakikada nanomolar düzeyde NO üretirken iNOS daha yüksek miktarda üretilmesini sağlamaktadır [78]. Her iki cNOS üyesinin aktivitesi kalsiyum iyon konsantrasyonuna bağlı olmasına rağmen iNOS bu parametreden bağımsız hareket etmektedir. NO birkaç yıldır onkogenik molekül olarak gösterilmesine rağmen NOS enzim aktivitesine ve salınmış NO'ya daha olumlu bakılmaktadır [77]. Bu kısmen NO salgılayan bileşiklerin kalp hastalıklarına karşı farmakolojik başarısı ve ayrıca bazı kanserlere karşı kemoterapi gibi etkilerinden kaynaklanmaktadır. NO'nun karsinogenezde DNA hasarı, onkogen aktivasyonu, DNA tamir mekanizması enzimlerinin ve tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu, apoptozun ve metestazın düzenlenmesi gibi önemli rolleri bulunmaktadır [78]. İmmün savunma sistemi tarafından üretilen NO'nun antitümör aktivitesi çeşitli hayvan çalışmalarında gösterilirken NO'nun protümör etkisi, ilerlemiş tümörlerde ve metastaz olan dokularda da NO üreten enzimlerin ekspresyonunun artması ile ilişkilendirilmiştir. Yıllar geçtikçe NO'nun kanserdeki dual rolü kabul edilmiştir [77].



Şekil 2.12. NO'nun çeşitli yollar üzerine etkileri [77].

2.13.1. NO'nin Kanserde Çeşitli Aktiviteleri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. NO'nin meme kanseri gelişiminde etkisi araştırılmıştır [79]. Meme kanseri dokularında ve hücrelerinde NOS ekspresyonu mevcuttur [80]. Normal ve bening meme dokusuna kıyasla invaziv meme kanseri dokusunda yüksek NOS aktivitesi mevcuttur. *In situ* karsinomada yüksek oranda NOS mevcut olduğu bildirilmiştir. Ayrıca meme kanseri ilerlemiş hastalarda NOS aktivitesi yüksek bulunmuştur [81]. NO'nin tümörün kontrolü üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Fibrokistik hastalığın meme apokrin metaplastik hücrelerinde eNOS'un bulunmasının, metaplastik epitelinin karsinoma ilerlemesini teşvik edebileceğini ileri sürmüşlerdir [82]. NO tümörde kan akışını ve anjiyogenezi arttırmaktadır. Buda tümörün derecesi ile NO üretimi arasındaki pozitif korelasyonu açıklamaktadır [81].

2.13.2. NO ve Hormonların Meme Kanseri ile İlişkisi

Diğer kanser tiplerinin aksine, meme kanserinde tümörler steroid hormonlar tarafından oldukça etkilenmektedirler. Son çalışmalara göre, NO yolağının bu hormonlar üzerine etki ettiği gösterilmiştir. Östrojen ve progesteron NOS'u düzenleyebilir ve bunun sonucunda üretilen NO, tümör hücresi homeostazı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Östrojenin, meme dokusunda NOS salınımını arttırdığı bulunmuştur [83]. eNOS ekspresyonunun meme kanserinde meydana gelen östrojen reseptör ekspresyonu ile korele olduğu görülmüştür [84]. Progesteron, iNOS ekspresyonunu artırır. eNOS tarafından üretilen düşük NO seviyesinin östrojenin proliferatif özelliğini düzenlemektedir. Diğer taraftan, progesterona cevap olarak apoptozdaki bir artış, iNOS ekspresyonunun indüklenmesi ile üretilen yüksek NO seviyelerine neden olabilmektedir [85].

2.13.3. iNOS ve NO

Hücrelerdeki üç farklı NOS enziminin varlığı, üretilen NO seviyelerinin bir yansıması olduğundan, raporlar NO'nun tümör büyümesinin dinamikleri ile ilişkisinin belirli özelliklerle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bunlar; her izoformun ürettiği NO miktarı ve hücredeki NOS türevli NO'nun kimyasal etkileşimleri NOS izoformlarının ifadesi olarak tanımlanmaktadır [86]. Bu üç NOS enzimi arasında en çok nitrik oksit üretimini iNOS yapmaktadır. Malign dönüşüm, anjiyogenez ve metastaz gibi tümör bağımlı önemli olaylar ve sitokin maruziyeti sonucunda eksprese olmaktadır [87]. iNOS ekspresyonu, pek çok insan ve deneysel hayvan modellerinde oluşan tümörlerde indükleyici etki gösterdiğinden dolayı, kanser patogeneğinde önemli bir

göstergedir ve iNOS ekspresyonunu seçici inhibitör gibi hareket eden bileşiklerin kemopreventif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

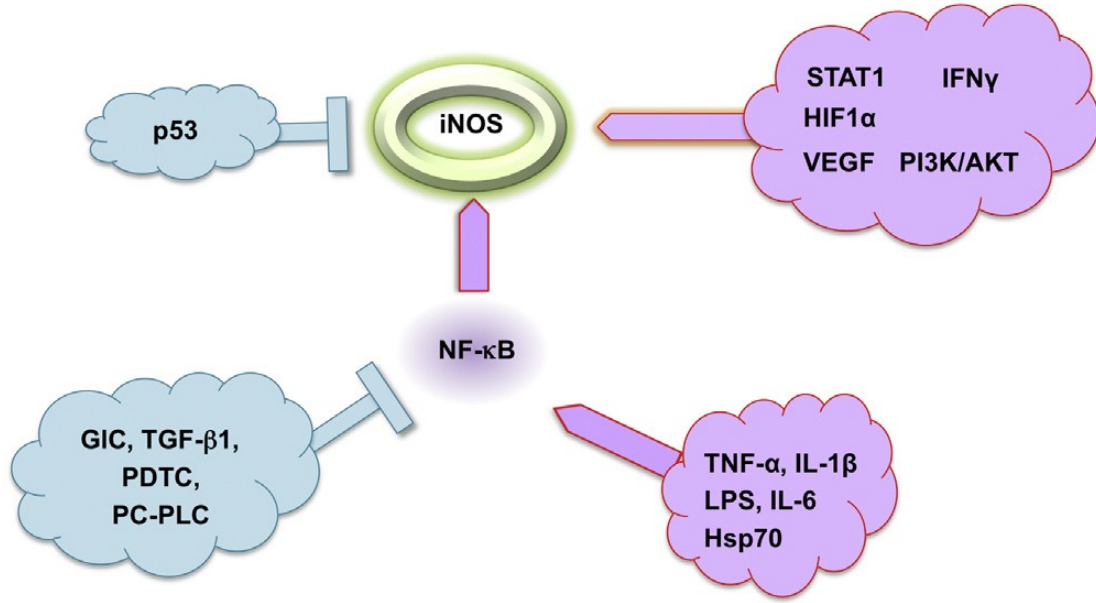
iNOS vasıtasıyla sentez edilen NO, angiogenezi, tümör hücre migrasyonunu, invazyon ve metastaz üzerine etki göstererek tümorogenezin başlamasının yanı sıra ilerlemesine neden olur. iNOS'un, angiogenezin indüklenmesinde görev alan, vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonunu indükleyerek mikrovasküler yoğunluğu ve tümör gelişimini artırdığı, iNOS geninin insan kolon kanser hücrelerine transdüksiyonunun, VEGF ekspresyonunda artışa sebep olduğu ve L-NAME ve L-NMMA gibi NOS inhibitörlerinin, murin ve insan tümörlerinde kan akımının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir [88].

2.13.4. iNOS Geni ve Düzenlenmesi

iNOS'un hücre çoğalması ve anti-tümör kinetiği üzerindeki rolünü anlamak için, iNOS geni ve iNOS düzenlenmesinin bilinmesi gerekmektedir. İnsan 17q11.2-q2 kromozomunda lokalizedir. iNOS promotorunda farklı polimorfizimler tanımlanmıştır [89]. iNOS geni üzerinde meydana gelen SNP, B- ve T-hücreli non-Hodgkin lenfoma riskini 2 kat arttırmaktadır [90]. iNOS, temel olarak inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu, oksidatif stres, hipoksi, endotoksinler ve Hsp 70 ile düzenlenmektedir [91].

Transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizma sonucunda birçok hücrede iNOS ekspresyonu indüklenir. En önemli hücre içi sinyal yolları NF- κ B ve JAK-STAT yollarıdır [92].

iNOS ekspresyonunun glukokortikoid, TGF- β 1 ve antioksidanlar gibi çeşitli ajanlar ile inhibisyonu sonucunda NF- κ B ve STAT-1 aktivasyonu inhibe olmaktadır (Şekil 2.13.) [93]. MAPK yolu iNOS gen ekspresyonuna ETS ailesinden cAMP-respons elementi, NF- κ B, AP1, ATF2 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile katkı sağlamaktadır [94]. iNOS gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlemesi, ağırlıklı olarak, mRNA stabilitesini etkileyen mekanizmalar yoluyla gerçekleşir [95].



Şekil 2.13. iNOS düzenlenmesinde transkripsiyon faktörü NF- κB'nin rolü (77).

2.13.5. Farmakolojik Yaklaşım

Statinler ve kolesterol, HMG-CoA redüktaz inhibe edici ajanlardır. Bu ajanlar iNOS indüksiyonu düzenleyerek apoptotik aktivite ve tümörsidal aktivite gösterirler [96]. Literatüre göre, statinler meme kanserinin de içerisinde bulunduğu birçok kansere karşı anti-kanser aktivite göstermektedir. Menopoz sonrası meme kanseri vakalarında hastaların statin kullanımları sonucu kanser tedavisinde başarı gözlemlenmiştir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, simvastatin ve fluvastatinin iNOS mRNA ve protein ekspresyonunu indüklediği, proliferasyonu azalttığı ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir [97]. ER-negatif ve 3'lü negatif metastatik meme kanserinde fluvastatin, iNOS türevli NO artışı ile anti-proliferatif ve anti-invaziv etki göstermiştir. Anti-tümör aktiviteye sahip kanser kemoterapi ajanları ile iNOS indüklenmesi ve inhibisyonuna karşı çalışmalar yapılmıştır [98]. Karaciğer kanseri hücrelerinde 5 flurourasilin, iNOS türevli NO ve apoptozu indüklemektedir. Diğer yandan NO-dönörleri ve kemoterapi ilaçları örnek olarak verecek olursak, aspirin (NO-dönörü steroid olmayan anti inflamatuvar ilaç), sitokinler ile indüklenmiş iNOS ekspresyonunu azaltmakta ve bunun sonucunda HT-29 kolon kanseri hücre hattında büyüme azalmaktadır [99]. Bir başka çalışmada azoksimetan ile oluşturulmuş kolon tümörü modelinde, NO donörü aspirin ve ibuprofen iNOS ekspresyonu ve aktivitesini inhibe ederek tümör insidansını azaltmıştır [100].

Hücre ve hayvan modellerinden ve insan kanserlerinden birçoğunu açıklamak için, tümör gelişimi, immün hücreler, tümörle ilişkili makrofajlar, kanser gelişiminde ve metastazda iNOS aracılı endotel ve epitel hücreleri arasındaki etkileşime ilişkin daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [101].

2.13.6. NO'nin İnflamasyon ile İlişkisi

Serin/Treonin kinaz düzenlediği Akt Ailesi sinyal yolağı, proliferasyon ve yaşamda kalım gibi çeşitli hücresel süreçleri etkiler ve bu hiperaktivasyon kanser ile ilişkilidir. NO üretimindeki artış Akt'nin PI3 kinaz yolağıyla fosforilasyona/aktivasyonuna neden olmaktadır. Meme kanserinde NOS2'nin ekspresyonundaki artış, fosforile Akt'nin ekspresyonundaki artış ile ilişkilidir. Reaktif oksijen ve nitrojen türler ve inflamatuvar hücrelerin fonksiyonları ile düzenlenmektedir. Kronik inflamasyon kanserin gelişmesine neden olmaktadır. Sitokinler inflamasyonun kritik düzenleyicileridir ve tümör gelişimini arttırıcı ve azaltıcı etki gösterebilirler. İnterferon gamma (IFN_γ), $TNF-\alpha$, IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler NOS2'yi aktive etmekte ve bunun sonucunda da NO üretimi gerçekleşmektedir. Buna rağmen NO'nin üretim ve sekresyonu $TNF-\alpha$, IL-6 ve IL-8'inde içinde bulunduğu farklı sitokinler tarafından düzenlenebilir. Lipopolisakkarid ve INF_γ uygulanmış murin makrofaj hücre hattında NO, $TNF-\alpha$ 'yı upregüle ederken, IL-6'yı downregüle etmektedir [102].

2.14. Likenler

Likenler, mantarlar ile alglerin birleşerek morfolojik ve fizyolojik bir bütün halinde meydana getirdikleri simbiyotik birliklerdir. Genellikle ağaçların dal ve gövdelerinde, kayaların üstünde yaşarlar. Krutoz likenleri taşlarda, fosillerde büyürken, frutikoz likenler toprakta, ağaçlarda büyürler. Temiz havada yaşarlar besine ihtiyaçları ise oldukça azdır. Yapısal olarak 3 farklı grupta toplanabilirler bunlar kabuksu likenler, yapraksı likenler ve çalimsı likenlerdir [103]. Bu organizmaları, parfümeri, sabun endüstrisi, kozmetikte fiksator olarak, floral dekorasyon ve medikal sektörde kullanılmaktadır [104]. Kemotaksonomik çalışmalara göre en önemli liken metabolitleri depsides, depsidones ve dibenzofuran sınıfına aittir. Genellikle zorlu yaşam koşullarında yer almaları ve yavaş büyümelerinden kaynaklı koruyucu metabolitlerin üretilmesi likenler için bir zorunluluk haline gelmektedir ve yapısında bulunan birçok ikincil bileşenin antimikrobiyal, antiproliferatif, antiviral, antiprotozal özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir [105]. Usnik asit, üzerinde en çok çalışma yapılan yüzlerce liken metabolitlerinden biridir. *Cladonia* (*Cladoniaceae*) (Şekil 2.14.), *Usnea* (*Usneaceae*) (Şekil 2.15.), *Lecanora* (*Lecanoraceae*), *Ramalina* (*Ramalinaceae*), *Evernia*, *Parmelia* (*Parmeliaceae*) ve diğer liken türleri arasında *Alectoria* (*Alectoriaceae*) türünün (Şekil 2.16.) usnik asit bakımından oldukça zengin olduğu ve bu bileşiğin yaklaşık olarak %6 olduğu bildirilmiştir [106].



Şekil 2.14. *Cladonia Portentosa* bitkisi [107].



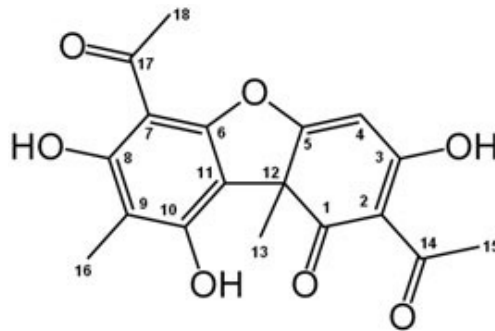
Şekil 2.15. *Usnea Barbata* bitkisi [108].



Şekil 2.16. *Alectoria* bitkisi [109].

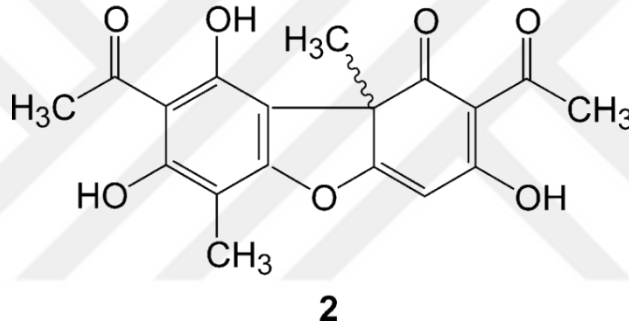
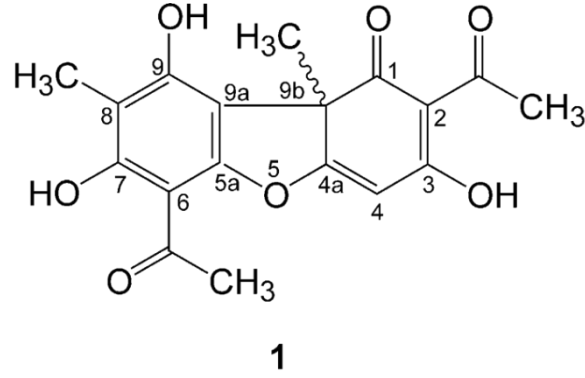
2.14.1. Usnik Asitin Kimyasal Yapısı ve Biyosentezi

Kimyasal formülü [2,6-diasetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandion] (Şekil 2.17.) olan usnik asit ilk olarak 1844 yılında izole edilmiştir [110].



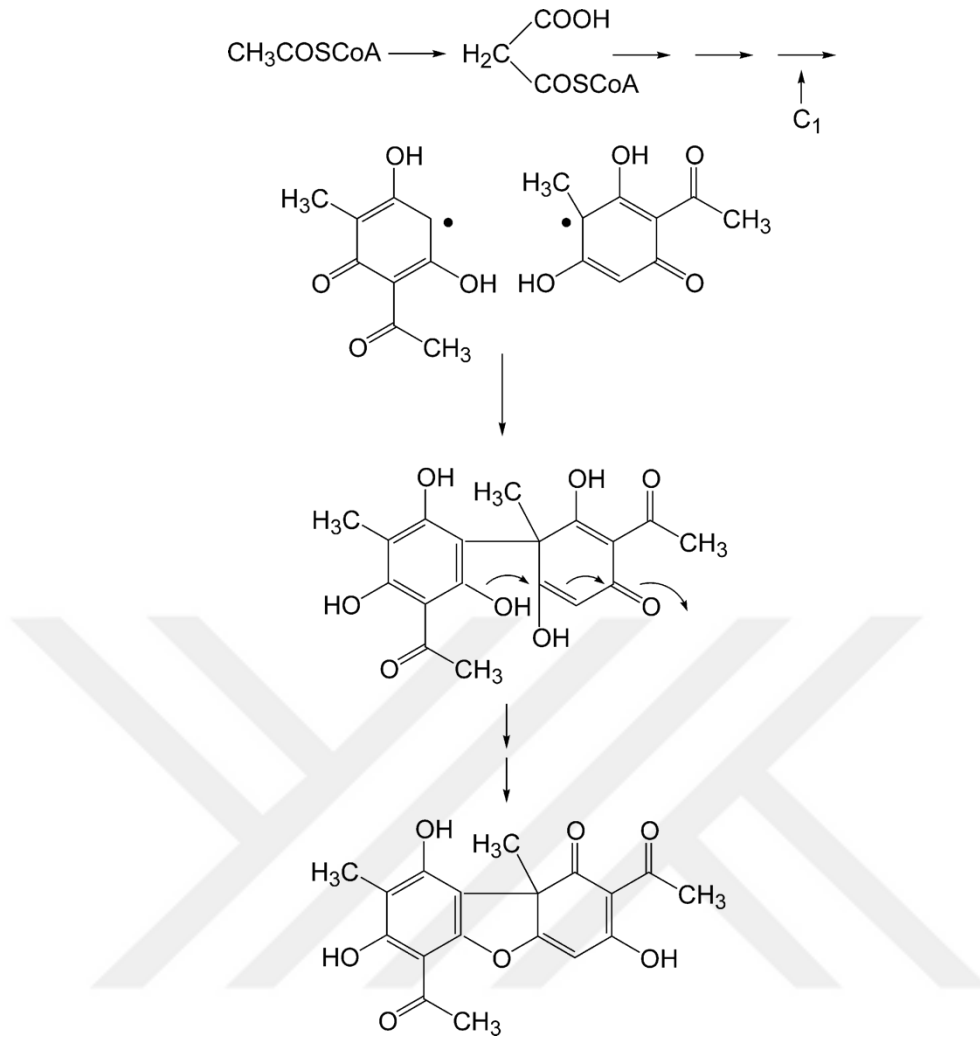
Şekil 2.17. Usnik asitin yapısı [110].

Sarı, kortikal pigment yapıda olup kiral 9b pozisyonundaki açılal metil grubundan kaynaklı iki enantiyomer formu mevcuttur (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Usnik asitin enantiyomer yapısı [110].

(+) usnik asit streokimyası ilk olarak 1981 yılında X-ray ile aydınlatılmıştır. 1,3 keto-enolik ve 1,3 diokso olası tautomer formlarıdır. Enol formundaki 3 numaralı hidroksil grubu, keto grubunun indüktif etkisinden dolayı kuvvetli asidik karaktere sahiptir (pKa 4.4.). Fenolik 9-OH'nin asitliği, 6 pozisyonunda para asetil grubun indüktif etkisiyle artmıştır. Likenlerde (+) usnik asit, (-) usnik asitin yanı sıra izo (+) usnik asit, izo (-) usnik asit mevcuttur.



Şekil 2.19. Usnik asidin sentez şeması [105].

Usnik asitin biyosentezi şekil 2.19.'da gösterilmiştir. Asetatı poliketite, poliketiti ise metilfloroasetofenona onuda C1 fragmenti ile aromatize hale getirir. Daha sonra, hidratlanmış usnik asit ve son olarak eter bağlantısı oluşumuna yol açan dehidrasyon sağlamak için iki metil asetofenon ünitesinin bağlanmasıdır [105].

2.14.2. Usnik Asit İçeren Likenlerin Medikal Kullanımı

Dünya genelinde usnik asit içeren likenler ham ilaç olarak kullanılmıştır. Birçok Cladonia türü akciğer tüberkülozunun tedavisinde kullanılmıştır. Asya, Afrika ve Avrupada Usnea türleri ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır [110]. *Usnea barbata*'dan izole edilen usnik asitin farmasötik preparatlar ve kozmetikte kullanılmıştır. Arjantin'de Barba del Piedra olarak bilinen *Usnea densirostra* çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [112]. Finlandiya da atletlerin ayağında meydana gelen yara ve diğer yaralanmaların yanı sıra diş ağrısı ve boğaz ağrısına karşı tedavide *Ramalina thrausta* kullanımı yaygındır [113].

2.14.3. Antioksidan ve Pro-Oksidan Aktiviteleri

Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri nörodejeneratif bozukluklar, inflamatuvar, kanser gibi çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol almaktadır [113]. Normal fizyolojik şartlarda, ROS/RNS intraselüler mesaj ve düzenleyici molekül olarak rol almaktadır. Bu denge antioksidan enzimler, moleküller ve proteinler tarafından düzenlenmektedir [114]. Biyolojik sistemlerdeki ikincil metabolitlerinin ana rolü redoks özellikleri ile ilişkilendirilmiştir [115].

Indomethasin'e maruz bırakılmış gastrik ülserli sıçanlarda usnik asitin antioksidan özellik gösterdiği bulunmuştur. Usnik asit uygulamasından sonra süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimleri artarken, malondialdehid (MDA) düzeyinin azaldığı bulunmuştur [116]. Antioksidan ve pro-oksidan ajanlar oksidatif stresin önlenmesi ve düzenlenmesinde oldukça önemli role sahiptirler. usnik asit'in redoks aktif özelliğe sahip olduğu ve farklı koşullar altından kimi zaman pro-oksidan kimi zaman antioksidan özellik gösterdiği literatürde belirtilmiştir [117]. Usnik asitin antioksidan etkisi likenin ikincil metabolitinin peroksil radikali temizleyici özellik göstermesi, hidroksil radikalini baskılaması ve nitrit oluşumunu azaltmasından ileri gelmektedir [115]. Diğer taraftan usnik asit pro-oksidan kapasite göstermektedir. Nöron hücrelerinde, hücre içi ROS üretimini artırarak hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir. UV-B uygulanmış insan lenfosit hücrelerinde *Xanthoparmelia farinosadan* ekstrakte edilmiş usnik asit uygulaması sonucunda yüksek konsantrasyonda hücre zarı ve metabolizmasına letal hasara sebep verirken, düşük konsantrasyonda antioksidan özellik gösterdiği belirlenmiştir [118]. Murin ve insan hücrelerinde - ve + usnik asit izomerleri ortadan kuvvetliye doğru sitotoksik aktivite göstermiştir [119]. Doz ve zamana bağlı olarak murin lösemi hücrelerinde usnik asit izomerinin apoptozu indüklediği bildirilmiştir [120]. Diğer çalışmalarda usnik asitin A2780 (over kanseri), MCF-7 (meme kanseri), HT-29 (kolon kanseri), HL-60, Jurkat (T-hücre lenfosit lösemi), HeLa (serviks kanseri), SK-BR-3 (meme kanseri), HCT-116 p53 +/- (kolon kanseri) gibi çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir [121]. Brisdelli ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 25 mM'dan daha yüksek konsantrasyondaki usnik asit'in yüksek sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [122].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Madde ve Çözücüler

- ✓ Mutlak etil alkol (Reidel-Haen, Almanya)
- ✓ Bidistile su
- ✓ RPMI 1640, Glutamin, 25 mM HEPES (Biowest, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ Fungizon (Amfoterisin B) 250 µg/mL, (Biowest, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ L-Glutamin 200 mM, (Biowest, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ Penisilin-Streptomisin, (Biowest, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ Fetal Bovin Serum (Biowest, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ Trypsin-EDTA w/ Phenol Red, (Biowest)
- ✓ DPBS-10X w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (Biowest, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ Usnik asit (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri)

3.1.2. Alet, Gereç ve Cihazlar

- ✓ Santrifüj (Sigma 1-14, Almanya)
- ✓ Etüv (Binder ED53, Almanya)
- ✓ -20 °C Derin dondurucu (Uğur Derin Dondurucu, Türkiye)
- ✓ -80 °C Derin dondurucu (Jouan, Danimarka)
- ✓ +4 °C Soğutucu (Uğur, Türkiye)
- ✓ 1,5 mL'lik eppendorf tüp (Isolab, Almanya)
- ✓ Otomatik ayarlanabilir pipet (Eppendorf, Almanya)
- ✓ Gerçek zamanlı PCR cihazı (Roche, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ ELISA okuyucu (Multiskan Go, Thermo Fischer Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ ELISA yıkayıcısı (Wellwash Versa, Thermo Fischer Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ Distile su cihazı (Millipore, Fransa)
- ✓ MicroAmp® Optical Adhesive Film (Kat No: 4360954, Thermo Fischer Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)

3.1.3. Kullanılan Kitler

- ✓ Cedex Smart Slide (Roche, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ E-plate 16, 1x6 plates (Acea)
- ✓ PGE₂ ELISA kiti (Kat No: L190109551, Uscn Life Science Inc., Wuhan, Çin)
- ✓ IL-6 ELISA kiti (Uscn Life Science Inc., Wuhan, Çin)
- ✓ DNA izolasyon kiti (Kat No: K182002, PureLink® Genomic DNA Mini Kit, Thermo Fischer Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ TNF- α ELISA kiti (Kat No: L190109552, Uscn Life Science Inc., Wuhan, Çin)
- ✓ Taqman Realtime PCR gen ekspresyon kiti (Kat No: 4440038, Thermo Fischer Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmada kullanılan insan meme adenokarsinomuna özgü MCF-7 hücre hattı Ankara Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) temin edildi. DMEM'e % 10 FBS, 2 mM L-glutamin, % 1 penisilin, streptomisin, amfoterisin-B eklendi. Hücreler 37°C, % 5'lik CO₂ atmosferinde inkübe edildi.

3.2 Yöntem

3.2.1. Usnik Asitin Hazırlanışı

Usnik asit sigma firmasından ticari olarak satın alınmıştır. 14 mM DMSO (Sigma) çözeltisinde hazırlandı.

3.2.2. Hücre Kültürü Ortamı

Deneyisel çalışmalar Mersin Üniversitesi İleri Araştırma Merkezi (MEİTAM) ve Eczacılık Biyokimya laboratuvarlarında yapıldı. Hücre kültürü çalışmaları laminar kabinde yapıldı. Çalışma öncesi ve sonrasında laminar kabin steril edilmek için etil alkol (% 70) ile silindi. Deney sırasında kullanılacak ekipmanlar UV ışığına maruz bırakıldı. Çalışma bitiminde kabin 1 saat UV ışığına maruz bırakıldı.

3.2.3. Hücre Pasajlama

Hücre pasajlaması hücre tipine göre uygun yöntem ve laminar kabin içerisinde steril şartlar altında aşağıda yazılan sıralama ile yapılmalıdır.

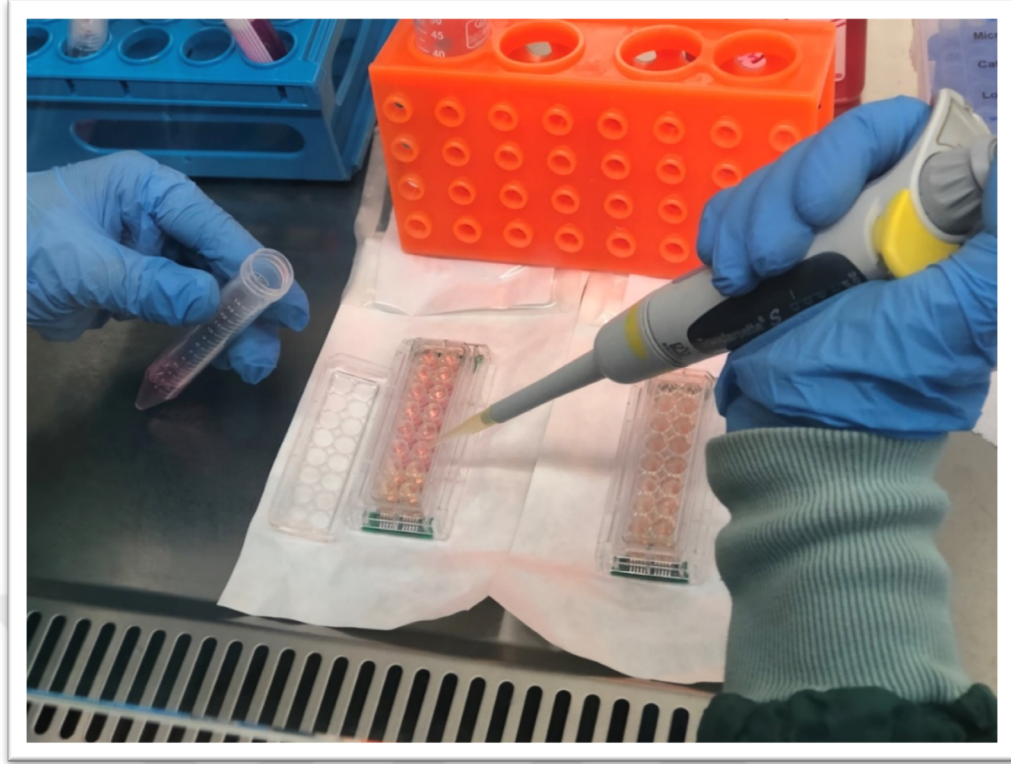
1. Hücrelerin bulunduğu flasktan hücre kültürü mediumu atık şişesine aktarıldı.
2. Flaskın hacmine göre uygun PBS miktarı ile yıkandı (10 cm²'lik alan için 2 mL PBS kullanılmalı).
3. Yıkama solüsyonu flasktan uzaklaştırıldı.
4. Flaska Trypsin-EDTA karışımından 3 mL eklenir ve 3 dakikada etüvde bekletildi. Bu işlem sonunda hücreler yüzeyden kaldırıldı.
5. Etüvden alınan flaska daha önce eklenen Trypsin-EDTA karışımı hacmi kadar hücre mediumu eklendi.
6. Flaskta kaldırılan hücreler 15 mL hacimli falkona aktarılır ve 2000×g de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant dökülür, pelet halindeki hücrelerin üzerine taze 10 mL medium eklenir ve yavaşça otomatik pipet ile karıştırma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.4. Hücrelerin Sayımı

Çalışmamızda Roche firmasına ait Cedex Smart Slide özel lamalar kullanıldı. Hücre sayımı 20 µL hücre 20 µL tripanblue boyası kullanılarak CEDEX XS hücre sayım cihazında gerçekleştirildi.

3.2.5. Sitotoksosite Testi

Hücrelere sitotoksosite testi ACEA firmasının xCELLigence sistemi ile yapıldı. E-plate'e 100 µL hücre uygulandı (Şekil 3.1.). Bu işlemden 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 µM) usnik asit uygulaması gerçekleştirildi. 48 saat sonunda veriler kaydedildi (Şekil 3.2.). Elde edilen verilere göre % inhibasyon eğrisi çıkarıldı ve LD₅₀ değeri belirlendi.



Şekil 3.1. Hücrelerin xCELLigence plakalarına eklenmesi.



Şekil 3.2. xCELLigence sistemi.

3.2.6. Hücrelere Usnik Asit Uygulaması

Çalışma grupları Grup I (kontrol), Grup II (LD₁₀), Grup III (LD₂₀), Grup IV (LD₃₀), Grup V (LD₄₀) ve Grup VI (LD₅₀) olarak belirlendi. 6 kuyulu plaka'ya 1x10⁶ hücre ekimi gerçekleştirildi. 48 saat sonra farklı konsantrasyonda (LD₁₀, LD₂₀, LD₃₀, LD₄₀, LD₅₀) usnik asit uygulaması yapıldı. Uygulama yapıldıktan 48 saat sonra hücreler plakadan kaldırılıp mRNA'ları izole edildi.

3.2.7. mRNA İzolasyonu:

mRNA izolasyon işlemi Roche firmasının "High Pure RNA Isolation Kit" ile yapıldı.

Uygulanan yöntem aşağıdaki gibidir:

1. 200 µL PBS'de resüspanse edilen hücrelere 400 µL Lizis/Binding Tamponu eklenir ve 15 saniye vorteks işlemi uygulandı.
2. Örnekler toplama tüpüne eklenir, 15 saniye 8000x g'de santrifüj edildi.
3. Toplama tüpünden filtre ayrılır, toplama tüpünde biriken sıvı döküldü.
4. Filtre tekrar toplama tüpüne yerleştirilir. 90 µL Dnaz I inkübasyon tamponuna 10 µL Dnaz I eklenir ve karıştırıldı. Filtre üzerine eklendi. 15-25 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda 500 µL yıkama tamponu I eklenir ve 15 saniye 8000x g'de santrifüj edilir. Toplama tüpünde biriken sıvı döküldü.
6. 500 µL yıkama tamponu II eklenir ve 15 saniye 8000x g'de santrifüj edilir. Toplama tüpünde biriken sıvı döküldü.
7. 200 µL yıkama tamponu II eklenir ve 2 dakika 13000x g'de santrifüj edilir. Toplama tüpünde biriken sıvı döküldü.
8. 85 µL elüsyon tamponu eklenir -80 °C'de cDNA sentez edilecek zamana kadar bekletildi.

3.2.8. cDNA Sentezi

cDNA sentezi ThermoFisher Scientific firmasının kit protokolüne göre yapıldı.

2X RT Master Miksi hazırlanması:

RT master miks buz üzerinde hazırlandı. Tablo 3.1.'e göre hazırlanıp buz üzerinde karıştırıldı.

Tablo 3.1. cDNA sentezi için oluşturulan reaksiyon karışımı.

Bileşim	Hacim
10x RT Tamponu	2 µL
25x dNTP mix (100 mM)	0,8 µL
10x RT random primerler	2 µL
MultiScribe Revers Transkriptaz	1 µL
RNaz inhibitörü	1 µL
Nükleaz-free su	3,2 µL
Total	10,0 µL

1. Tüplere 10 µL 2XRT master miks eklendi.
2. 10 µL RNA örneği tüplere eklendi ve karıştırıldı.
3. Baloncukları gidermek için santrifüj edildi.
4. Tüpler Termal Cycler Cihazına yüklendi ve inkübe edildi. (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. İnkübasyon aşamaları.

Ayarlar	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.2.9. Gen Ekspresyonu Ölçümü

1. Örnekler'den elde edilen cDNA'ların bulunduğu ependorf tüpler buza konuldu.
2. Tabloya uygun şekilde total PCR reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Gen ekspresyonu ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Komponent	Reaksiyon için kullanılan hacim
Master miks (2X)	10 µL
TaqMan® Gen ekspresyon Assay (20X)	1 µL
Nükleaz-free su	7 µL
Total PCR reaksiyon karışımı hacmi	18 µL

3. Plak'a uygun hacimde PCR karışımı dağıtıldı.

4. Plak'a uygun miktarda cDNA eklendi.

5. Vortekslendi.

6. Santrifüj edildi.

Real-Time PCR protokolünde, inkübasyon aşamasında 50 °C'de 2 dakika UDG enzyme aktive olması için bekletildi. 95 °C'de 10 dakika AmpliTaq Gold, UP enzyme aktive olması için bekletildi. Amplifikasyon 2 aşamada gerçekleştirilmiştir, aşağıdaki döngü 40 defa tekrarlandı. 1. aşamada 95 °C'de 15 saniye DNA'nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi (denatürasyon), 2. aşamada 60 °C'de 60 saniye (Amplifikasyon) Soğutma aşamasında ise 40 °C'de 30 sn bekletildi.

Gen ekspresyon ölçümü iNOS geni için (Hs00167257_m1), COX-2 geni için ise (Hs00153133_m1) r n kodlu taqman probe ile ölçüldü. β -aktin kontrol geni olarak kullanıldı. Elde edilen veriler. 2- $\Delta\Delta C_T$ metodu ile analiz edildi.

3.2.10. Hücrelerde PGE₂ Düzeyi Ölçümü

Hücrelerin PGE₂ düzeyleri sandviç enzim bağlı immünoassay (ELISA) yöntemiyle ticari kit kullanılarak Multiskan (Thermo Scientific) cihazında ölçüldü. Testin prensibinde plak kuyucukları PGE₂'e karşı geliştirilmiş spesifik bir antikor ile kaplanmıştır. Biotin ile etiketlenmiş PGE₂ analogları ile etiketlenmemiş antijen (standartlar veya örnekler) arasında rekabetçi bir inhibisyon reaksiyonu başlatılır. Avidin ile işaretli peroksidaz enzimi biyotinle işaretli konjugatlara bağlanır ve renk değişimi meydana gelir. Stop solüsyonun eklenmesi ile bu değişim son bulur. Çözelti rengi maviden sarıya döner oluşan bu rengin yoğunluğu 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerin konsantrasyonu standart eğriye göre hesaplandı.

1. Bütün örnekler, standartlar ve reaktifler hazırlandı.
2. Her kuyuya 50 mL standart ya da örnek konulur ve ardından 50 mL Detection Reagent A hemen uygulandı.
3. Karıştırıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
4. Aspire edildi ve 3 kez yıkama solusyonu ile yıkandı.
5. 100 mL Detection Reagent B eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
6. Aspire edildi ve 5 kez yıkama solusyonu ile yıkandı.
7. 90 mL substrat solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 10-20 dakika inkübe edildi.
8. 50 mL stop solüsyonu eklendi ve 450 nm dalga boyunda okundu.

3.2.11. NO Ölçümü

Nitrik oksit, yarı ömrü çok kısa olan bir madde olup oksidasyon ile stabil metabolitleri olan nitrat ve nitrite dönüşür. Bu mekanizma, NO seviyesinin dolaylı olarak ölçülmesine imkan sağlar ve genellikle bu metabolitlerin tespiti ile NO düzeyi değerlendirilir. Bu bağlamda nitrik oksit miktarı Miranda ve ark.'nın "Vanadium-3-klorür-Gries Reaksiyonu" yöntemi ile belirlendi [123].

Prensip: Ölçüm, Vanadium klorür'ün, 37 °C'lik ortamda nitratı nitrite dönüştürmesi ve Gries Reaksiyonu olarak tanımlanan, nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin olan sülfanilamit ile diazotizasyonu ve N-(1-naphthyl) ethylenediamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanmaktadır.

Reaktifler:

-Vanadium klorür çözeltisi: 50 mL % 2'lik hidroklorik asitte, 400 mg vanadium klorür çözdürülmesiyle hazırlandı.

-Sülfanilamit çözeltisi: 2 g sülfanilamitin, % 2'lik hidroklorik asit ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

-NEDD çözeltisi: Distile su ile hazırlanmış % 0,1'lik NEDD çözeltisidir.

Yöntemin uygulanışı: Hücre homojenizatları üzerine 100 µL vanadium klorür çözeltisinden eklendi, bunun üzerine seri halde 50 µL sülfanilamit ve 50 µL NEDD çözeltileri ilave edildi. Örnekler, 37°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 550 nm'de absorbans değerleri okundu. Sonuçlar, daha önce değişik konsantrasyonlardaki sodyum nitratın absorbans değerlerine göre hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirildi.

3.2.12. Hücrelerde TNF-α Düzeyi Ölçümü

Hücrelerin TNF-α düzeyleri ELISA yöntemiyle ticari kit kullanılarak Multiskan (Thermo Scientific) cihazında ölçüldü. Testin prensibinde plak kuyucukları TNF-α proteinlerine karşı geliştirilmiş spesifik bir antikor ile kaplanmıştır. Standartlar ya da örnekler plak kuyucuklarına uygun miktarda eklenmesi ile birlikte ortamda mevcut durumdaki TNF-α proteinleri sabit faza yapışık antikorlarca tutulurlar. Daha sonra TNF-α proteinleri spesifik antikor olan bir biyotinle işaretlenmiş konjugatla tekrar bağlanır ve sandviç yapısı meydana getirir. Avidin ile işaretli

peroksidaz enzimi biyotinle işaretli konjugatlara bağlanır ve renk değişimi meydana gelir. Enzim-substrat reaksiyonu sülfirik asit solüsyonu içeren stop solüsyonun eklenmesi ile son bulur. Çözelti rengi maviden sarıya döner oluşan bu rengin yoğunluğu 450 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerin konsantrasyonu standart eğriye göre hesaplandı.

Çalışma prosedürü:

Bütün örnekler, standartlar ve reaktifler hazırlandı.

1. Kit içeriği ve örnekler oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
2. Standartlar seri sulandırıldı.
3. İlk 7 kuyucuğa farklı konsantrasyonda hazırlanan standartlar pipetlendi 8. kuyucuğa ise kör pipetlendi.
4. Geri kalan kuyucuklara 100 µL standart ya da örnek konulur ve ardından 100 µL Detection Reagent A hemen uygulandı.
5. Karıştırılır ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
6. Aspire edilir ve 3 kez yıkama solusyonu ile yıkandı.
7. 100 mL Detection Reagent B eklendi. 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
8. Aspire edildi ve 5 kez yıkama solusyonu ile yıkandı.
9. 90 mL substrat solüsyonu eklendi ve 37 °C’de 10-20 dakika inkübe edildi.
10. 50 mL stop solüsyonu eklenir ve 450 nm dalga boyunda okunur.

3.2.13. Hücrelerde IL-6 Düzeyi Ölçümü

Hücrelerin IL-6 düzeyleri ELISA yöntemiyle ticari kit kullanılarak Multiskan (Thermo Scientific) cihazında ölçüldü. Testin prensibinde plak kuyucukları IL- 6 proteinlerine karşı geliştirilmiş spesifik bir antikor ile kaplanmış. Standartlar yada örnekler plak kuyucuklarına uygun miktarda eklenmesi ile birlikte ortamda mevcut durumdaki IL-6 proteinleri sabit faza yapışık antikorlarca tutulurlar. Daha sonra IL-6 proteinleri spesifik antikor olan bir biyotinle işaretlenmiş konjugatla tekrar bağlanır ve sandviç yapısı meydana getirir. Avidin ile işaretli peroksidaz enzimi biyotinle işaretli konjugatlara bağlanır ve renk değişimi meydana gelir. Enzim-substrat reaksiyonu sulfirik asit solüsyonu içeren stop solüsyonun eklenmesi ile son bulur. Çözelti rengi maviden sarıya döner oluşan bu rengin yoğunluğu 450 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerin konsantrasyonu standart eğriye göre hesaplandı.

Çalışma prosedürü:

1. Kit içeriği ve örnekler oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
2. Standartlar seri sulandırıldı.
3. İlk 7 kuyucuğa farklı konsantrasyonda hazırlanan standartlar pipetlenir 8. kuyucuğa ise kör pipetlendi.
4. Geri kalan kuyucuklara 100 µL standart ya da örnek konulur ve ardından 100 µL Detection Reagent A hemen uygulandı.
5. Karıştırılır ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
6. Aspire edilir ve 3 kez yıkama solusyonu ile yıkandı.
7. 100 mL Detection Reagent B eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
8. Aspire edildi ve 5 kez yıkama solusyonu ile yıkandı.
9. 90 mL substrat solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 10-20 dakika inkübe edildi.
10. 50 mL stop solüsyonu eklendi ve 450 nm dalga boyunda okundu.

3.3. İstatistiksel yöntemler

İstatistiksel analizler için SPSS 25 (Statistical Package for Social Scicences) paket programı kullanıldı. TNF- α , NO, IL-6, PGE₂ düzeyleri ile COX-2 ve iNOS gen ekspresyon değişkenlerinin Shapiro-Wilk testine göre normal dağılıma sahip olduğu görüldü ($p>0,05$). Birbirinden bağımsız olan gruplarının karşılaştırılması için normal dağılıma uyan değişkenler için ANOVA ve alt grup karşılaştırmalarında Bonferroni çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Testlerde istatistiksel anlamlılık derecesi ise $p<0,05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

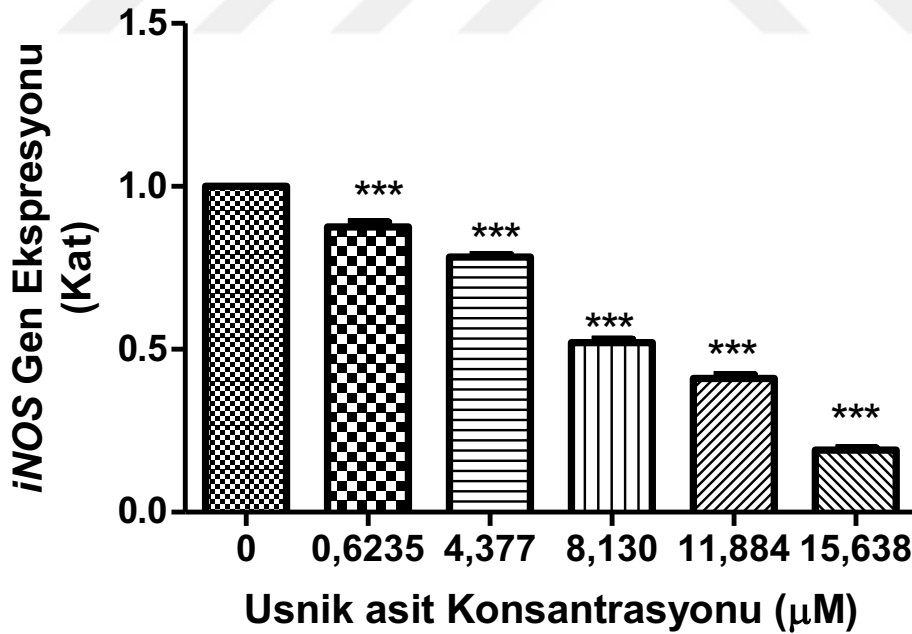
4.1. Bulgular

Yapılan sitotoksisite testine göre LD₁₀, LD₂₀, LD₃₀, LD₄₀, LD₅₀ değerleri sırasıyla 0,623, 4,376, 8,130, 11,884, 15,638 μ M olarak bulundu.

4.1.1. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in iNOS Gen Ekspresyonuna Etkileri

Her grubun iNOS gen ekspresyonu, aynı örneğin beta aktin gen ekspresyonları ile oranlandı. Herhangi bir uygulama yapılmayan Grup I kontrol grubu olarak kabul edilerek diğer grupların gen ekspresyonları kontrol grubuna oranlanarak hesaplandı. Çalışma 3 kez tekrar edildi.

Buna göre Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın rölatif gen ekspresyonları sırayla 1 ± 0 , $0,876\pm0,015$, $0,783\pm0,01$, $0,521\pm0,01$, $0,411\pm0,01$, $0,190\pm0,006$ bulundu. Tüm grupların iNOS gen ekspresyonu Şekil 4.1.'de gösterildi. Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın iNOS gen ekspresyonu doza bağlı olarak Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0,05$).



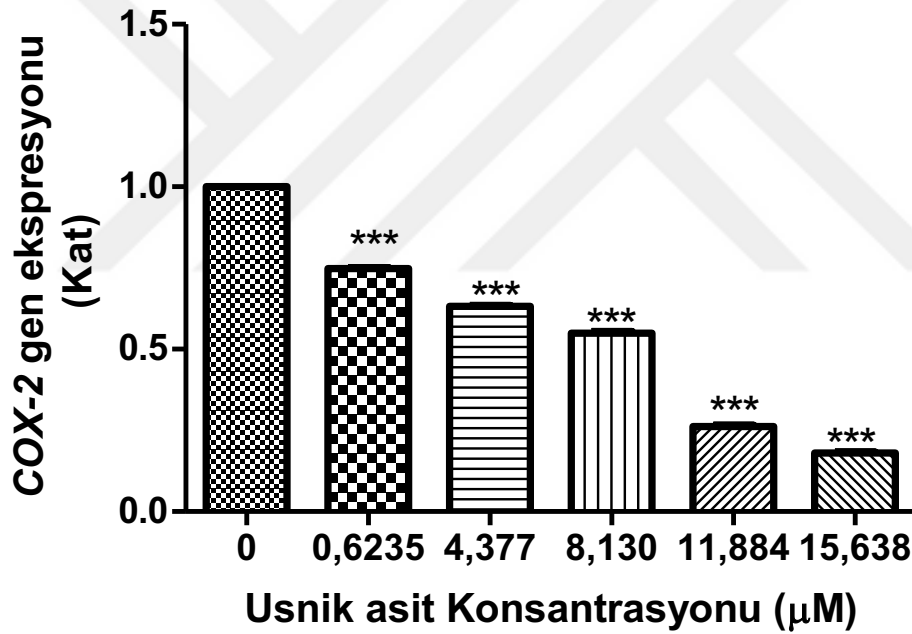
Şekil 4.1. iNOS gen ekspresyonu düzeyleri (n=3)

*** Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0,05$).

4.1.2. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in COX-2 Gen Ekspresyonuna Etkileri

Grupların COX-2 gen ekspresyonu, aynı örneğin beta aktin gen ekspresyonları ile oranlandı. Herhangi bir uygulama yapılmayan Grup I kontrol grubu olarak kabul edilerek diğer grupların gen ekspresyonları kontrol grubuna oranlanarak hesaplandı. Çalışma 3 kez tekrar edildi.

Buna göre Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın rölatif gen ekspresyonları sırayla 1 ± 0 , $0,75 \pm 0,003$, $0,632 \pm 0,003$, $0,55 \pm 0,004$, $0,261 \pm 0,005$, $0,181 \pm 0,002$ bulundu. Tüm grupların COX-2 gen ekspresyonu Şekil 4.2.'de gösterildi. Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın COX-2 gen ekspresyonu doza bağlı olarak Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0,05$).



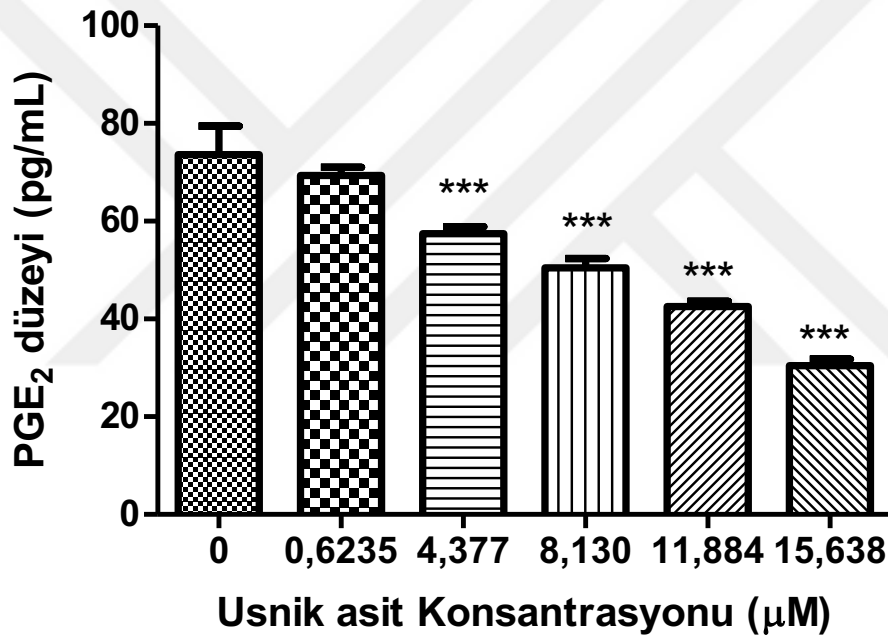
Şekil 4.2. COX-2 gen ekspresyonu düzeyleri(n=3)

*** Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0,05$).

4.1.3. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in PGE₂ Düzeyi Üzerine Etkisi

Her gruptaki örneklerinin PGE₂ seviyesi ELISA yöntemiyle ölçüldü. Çalışma 3 kez tekrar edildi. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edildi.

Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın PGE₂ seviyesi sırayla 73,67±5,82, 69,4±1,64, 57,43±1,40, 50,43±1,91, 42,5±1,15, 30,47±1,30 bulundu. Tüm grupların PGE₂ seviyesi Şekil 4.3.'de gösterildi. Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın PGE₂ seviyeleri doza bağlı olarak Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0,05$). Grup II'nin PGE₂ düzeyi kontrole göre düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($p>0,05$).

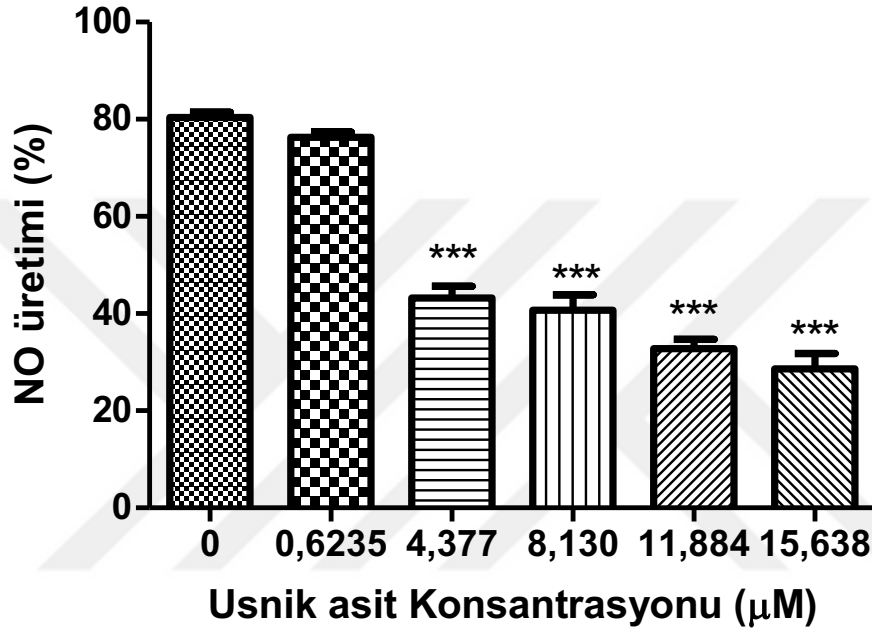


Şekil 4.3. Grupların PGE₂ seviyeleri (n=3).

*** Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0,05$).

4.1.4. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in NO Seviyesi Üzerine Etkisi

NO seviyesi Griss yöntemiyle ölçüldü. Çalışma 3 kez tekrar edildi. Buna göre Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın NO seviyeleri sırayla $80,33 \pm 1,15$, $76,27 \pm 1,12$, $43,2 \pm 2,44$, $40,67 \pm 3,22$, $32,8 \pm 1,95$, $28,60 \pm 3,18$ olarak saptandı (Şekil 4.4.). Grup III, Grup IV, Grup IV ve Grup VI'nın NO seviyeleri doza bağlı olarak Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0,05$). Grup II' deki NO düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamı saptandı ($p > 0,05$).



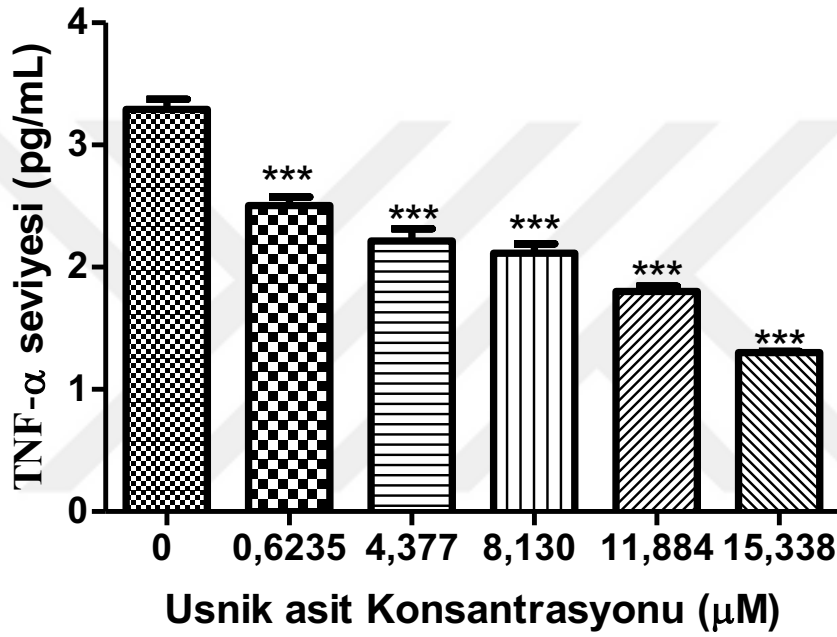
Şekil 4.4. Grupların NO seviyeleri (n=3).

*** Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0,05$).

4.1.5. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in TNF- α Seviyesi Üzerine Etkisi

TNF- α seviyesi ELISA yöntemiyle ölçüldü. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edilmiştir. Çalışma 3 kez tekrar edildi.

Buna göre Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın TNF- α seviyesi sırayla $3,293 \pm 0,08$, $2,51 \pm 0,068$, $2,21 \pm 0,1$, $2,11 \pm 0,8$, $1,80 \pm 0,04$, $1,30 \pm 0,01$ bulundu. Tüm grupların TNF- α seviyesi Şekil 4.5.'de gösterildi. Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın TNF- α seviyeleri kontrole göre istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0,05$).



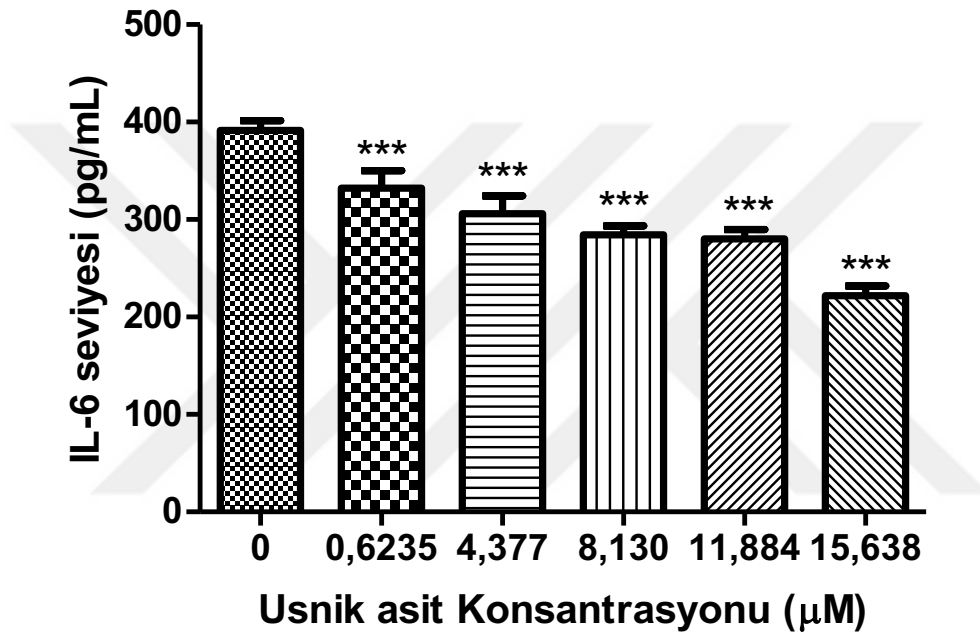
Şekil 4.5. Grupların TNF- α seviyeleri (n=3).

*** Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0,05$).

4.1.6. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan Usnik Asit'in IL-6 Seviyesi Üzerine Etkisi

Her grubun örneklerinin IL-6 seviyesi ELISA yöntemiyle ölçüldü. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edildi. Çalışma 3 kez tekrar edildi.

Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup IV ve Grup VI'nın IL-6 seviyesi $391,67 \pm 9,61$, $332,33 \pm 17,79$, $306 \pm 18,52$, $284,33 \pm 9,02$, $280 \pm 9,85$, $222 \pm 9,85$ olarak bulundu (Şekil 4.6.). Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın IL-6 seviyeleri doza bağlı olarak Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0,05$).



Şekil 4.6. Grupların IL-6 seviyeleri (n=3).

*** Grup I'e kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0,05$).

4.2. Tartışma

Meme kanseri kadınlar arasında en çok tanısı konan ve ölüme sebebiyet veren kanser türüdür [3]. Yeni tedavi stratejileri tasarlanırken çeşitli moleküler yolları hedeflemeli sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini yok etmeli ya da en azından bu hücreleri çoğalmalarının engellenmesine yardımcı olabilmelidir. Doğal ürünler, kanser tedavisinde yeni ilaç formülasyonları açısından potansiyel kaynak oluşturmaktadır [124]. Bazı araştırmacılar son zamanlarda biyolojik organizmalardan elde edilen doğal metabolitlerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini göstermişlerdir [125]. Son yıllarda, bazı bitkisel kökenli metabolitler ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır ve birçok potansiyel metabolitin ilaç endüstrisinde yer alması adına halen araştırılması gerekmektedir.

Liken türleri ve bunlardan izole edilen metabolitler ilaç endüstrisinde kullanılabilir. Likenden elde edilen ikincil metabolitlerden biri usnik asittir [126,127]. Literatürde usnik asidin kanser hücre hatlarında güçlü bir şekilde etkili olduğu gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz literatür taramalarında MCF-7 meme kanseri hücre hattında usnik asitin antiinflamatuvar etkisi ile ilgili çalışma bulunamamıştır. Kılıç ve ark. yapmış oldukları çalışmada usnik asid'in LD₅₀ değerini 13,11µM olarak bulmuşlardır; bizim çalışmamızda ise bu değer 15,638 µM olarak belirlenmiştir [128]. HeLa, MDA-MB-231, A549 ve MiaPaca kanser hücre hattında usnik asit antiproliferatif etki gösterdiği Mallavadhani ve ark. tarafından gösterilmiştir. Bizim çalışmamıza göre usnik asit doza bağımlı olarak MCF-7 hücre hattında antiproliferatif etki göstermiştir Liken metabolitlerinin mitotik etki göstermesinin yanı sıra apoptozu başlattığı rapor edilmiştir [129].

Farmakolojik çalışmalar usnik asitin antioksidan özellikleri üzerine odaklanmıştır. Usnik asit bazı antioksidanlar gibi farklı şartlar altında pro-oksidan aktivite göstermiştir. Polat ve arkadaşları, usnik asitin konsantrasyona bağlı olarak antioksidan ve prooksidan etki gösterdiğini bildirmiştir. ROS üretimi ve oksidatif stresin usnik asit toksisitesi ile ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır [130]. Han ve arkadaşlarına göre, usnik asit fare karaciğer hücrelerinde oksidatif stresini indüklemiştir [131].

İnflamasyon; patojen, uyarıcı, aberant hücreler gibi çeşitli zararlı uyarıcılara karşı vasküler dokularda meydana gelen kompleks biyokimyasal ve immün bir süreçtir. Fizyolojik olarak bakıldığında vücudun savunma mekanizmasının doku hasarından sonra veya enfeksiyona karşı göstermiş olduğu reaksiyondur.

İnflamasyonun kanseri tetiklediği bilinmektedir [49,52]. Eikosanoidler üzerinde yapılan birçok farmakolojik çalışmada, kanser gelişimi ve prognoz üzerindeki rollerine vurgu yapılmaktadır [136,137]. PLA2, COX-1, COX-2 ve mPGES-1 genleri nakavt edilmiş hayvan

modelleri üzerinde yapılan bir araştırmada genlerin knock out edilmesi sonucunda prostaglandin sentezinin inhibe olmasından kaynaklı tümör hücrelerinin gelişiminin baskılandığı gösterilmiştir [134-136]. COX-2 ve LOX enzimatik aktiviteleri ve bunların yan ürünlerinin, birçok kanserin gelişimi için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. mPGES-1 ve COX2 genlerinin meme, kolon, prostat kanserlerinde aşırı eksprese oldukları görülmüştür. COX-2 aracılığıyla meydana gelen PGE2'nin, anjiyogenezi teşvik edilmesi, hücresel proliferasyonu, anjiyogenezi uyarılması sonucunda kanserin gelişmesini sağlamaktadır [137-139]. Bağışıklık sisteminin baskılanması tümör gelişimi ile ilişkili en yaygın klinik tablodur [140]. Tümör hücrelerinin aşırı miktarda immünsüpresif mediatör üreterek immün sürveyansı zayıflatığı gösterilmiştir.

COX-2'nin kristal yapısının aydınlatılması ve izolasyonu, yeni tedavi seçenekleri ve ilaç tasarımları için önemli bir yol açmıştır. NSAID'lerin istenmeyen yan etkilerinin, COX1'i inhibe etmesinden kaynaklandığı yaygın bir algıydı COX2'nin keşfi, antiinflamatuvar tedavide devrim yarattı. Bu nedenle, seçici COX-2 inhibitörlerinin kullanılması klasik NSAID'ler gibi benzer terapötik aktivite üretmesi ve daha az yan etkiye sebep vermesi beklenmiştir [141]. Denbinobin, NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek konsantrasyona bağlı bir şekilde iNOS ve COX-2 aktivitesini azaltır [142]. Genistein'in, MCF10A'da TPA kaynaklı COX-2 ekspresyonunu ve NF- κ B'nin transkripsiyonel aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [143]. Bir başka çalışmada, resveratrolün COX-2 ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir [144]. Silibinin'in, ER α 'nın ekspresyonunu azaltarak meme kanseri hücre hattında sitotoksik aktivite sergilediğini ve silibinin antikanser aktivitesinin, Wnt / LRP6 sinyalinin baskılanmasıyla ilişkili olduğunu ayrıca, meme kanseri hücrelerinde COX-2 ekspresyonunu inhibe ederek TPA kaynaklı MMP-9 ekspresyonunu düşürdüğü bildirilmiştir [145,146]. Çalışmamızda usnik asitin COX-2 gen ekspresyonu seviyesini konsantrasyona bağlı olarak azaldığı ve Grup I'e oranla Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın rölatif gen ekspresyonları sırayla % 25, % 36,8, % 45, %73,9, %81,9 oranında azaldığı belirlenmiştir. Kontrol grubu ile usnik asit uygulanmış gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

iNOS (NOS2) ve eNOS (NOS3) NOS'ın izoformlarıdır ve MCF-7'nin de içerisinde olduğu birçok kötü huylu tümör ve hücre hattında eksprese edilirler. Zeybek ve ark., MCF-7 hücre hattında Gemcitabine ve Vinorelbine'nin eNOS ve iNOS üzerine olan etkilerini incelemişler ve bu ilaçların iNOS üzerinde bir değişime sebebiyet vermediğini bulmuşlardır. Ca^{+2} bağımsız iNOS, çok miktarda NO üretilmesine neden olmuştur. NO miktarının fazlalığı DNA ve protein yapısına zarar verebilir. Literatürde tümör gelişiminin ilk evrelerinde iNOS'un meme neoplazisinin artışında rol aldığı belirtilmiştir [147]. Crowel ve ark., yapmış oldukları hayvan çalışmalarıyla iNOS'un kolon kanserinde karsinogenezi arttırıcı etkisi olduğunu ayrıca iNOS inhibitörlerinin kemopreventif etki gösterdiğini bildirmişlerdir [148].

Oktem ve ark., doksorobisin ve dotatakselin MCF-7 hücre hattında iNOS, NO üretimi ve sitotoksosite ilişkilerini incelemişler, meme kanserinde kullanılan dotatakselin iNOS ekspresyonunu inhibe ettiği bununla birlikte NO üretim seviyelerinin azalttığını bildirmişlerdir [149]. Bu çalışmada usnik asitin iNOS gen ekspresyon seviyeleri Grup I'e oranla diğer gruplarda konsantrasyona bağlı olarak % 12,4 % 21,7 % 47,9 % 58,9 % 81 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

NO, tümör kan akışını ve anjiyogenezi arttırdığından dolayı kanser biyolojisinde paradoksal role sahiptir. NO yarım ömrü kısa süreli olan serbest radikaldır. Daha önceki çalışmalara göre fazla ve düzensiz NO sentezi tümör hücrelerinin metastazını ve tümör oluşumunu desteklemektedir. NO ayrıca hücre proliferasyonunu azaltmakta ve yüksek konsantrasyonlarında apoptozu indüklemektedir. Meme kanserinde artmış NO üretimi TNF- α , forbol ester, peptid hormonlar gibi çeşitli apoptotik ajanlar ile düzenlenmiştir. Kumar ve ark., MCF-7 hücre hattı üzerinde *Fraxinus micrantha* ekstraktının doza bağlı olarak antiproliferatif aktivite gösterirken NO üretimini arttırdığını göstermiştir. [150].

Rezakhani ve ark., yengeç kabuğundan elde ettikleri ekstraktları MCF-7 meme kanseri hücre hattına uyguladıklarında doza bağlı olarak anti-proliferatif aktivitenin yanı sıra NO seviyelerinde düşüş gözlemlemişlerdir. MCF-7 hücrelerinde inhibitör özelliği NO sekresyonundaki düşüş, COX-2 ekspresyonundaki azalmaya ve sitokin ekspresyonunda azalmadan ileri geldiğini düşünülmektedir [151].

Çalışmamızda usnik asitin NO seviyesini konsantrasyona bağlı olarak azalttığı Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'nın $80,33\pm1,15$, $76,27\pm 1,12$, $43,2\pm 2,44$, $40,67\pm3,22$, $32,8\pm1,5$, $28,60\pm3,18$ belirlenmiş olup. Kontrol grubu ile usnik asit uygulanmış gruplar (Grup II dışında) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile korelasyon göstermiştir.

Böylece inflamasyon gelişiminde önemli genlerden olan COX-2 ve iNOS'un hedeflenmesi kanserin erken teşhisinin yanı sıra tedavide yeni stratejilerin geliştirilmesinde önem arz etmektedir.

TNF- α viral replikasyon, proliferasyon ve apoptoz gibi önemli fizyolojik olaylarda önemli role sahiptir. Dahası, artmış TNF- α seviyeleri NF- κ B'yı aktive ederek tümör gelişimine sebep olmaktadır. TNF seviyeleri invaziv meme kanserli hastalarda beningli olan dokulara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir [148].

Hem östrojen pozitif hem östrojen negatif hücre hatlarında IL-6 invazivliği ve tümör büyümesini indüklemektedir. Buna ek olarak, pro ve anti inflamatuvar sitokin olarak akut faz

cevabıdır. Deniz süngeri *Geodia cydonium*'den elde edilen ekstrakt MCF-7 hücre hattında IL-6, TNF- α ve IL1 β sitokinlerini inhibe etmiştir.

Çalışmamızda IL-6 seviyeleri Grup I'e kıyasla Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'da % 15,15, % 21,87, % 27,4, % 28,51, % 43,32 oranda azaldığını ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu görmekteyiz ($p < 0,05$).

TNF- α ve NO'nin aşırı üretimi insan vücudu için zararlı olan aşırı inflamasyon reaksiyonların artışına sebep olmaktadır [152]. Usnik asitin, LPS-ile indüklenen RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde TNF- α ve NO üretimini doza bağımlı olarak azalttığı bildirilmiştir [153].

Farklı konsantrasyonlarda usnik asit uygulanan deney gruplarına baktığımızda TNF- α seviyesi konsantrasyona bağlı olarak azaldığı bu değerlerin Grup II'de % 23,7, Grup III'de % 32,9, Grup IV'de % 36, Grup V'de % 45 ve Grup VI'da % 60 olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile usnik asit uygulanmış gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Vijayakumar ve arkadaşları, deney hayvanlarında oluşturulmuş kronik ve akut inflamasyon modellerine karşı *Rocella montagnei* likeninden izole edilen usnik asitin doza bağımlı olarak antiinflamatuvar özellik gösterdiğini ve sıçanlarda karagenin ile oluşturulmuş pençe ödemi doza bağımlı olarak azalttığı, analjezik ve ateş düşürücü etki göstermesinin yanı sıra mekanizma olarak diğer steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar gibi prostaglandin sentezini inhibe ettiğini belirlemişlerdir [154].

Su ve arkadaşları, farelerde LPS ile oluşturulmuş akut akciğer hasarına karşı usnik asit'in koruyucu etki göstermesinin yanı sıra inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığını ve usnik asit'in TNF- α , IL-6, IL-8, makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) ekspresyonunu azalttığı da bildirilmiştir [155]. Huang ve arkadaşları, LPS ile stimüle edilmiş RAW-264.7 hücre hattında yaptıkları çalışmada doza bağımlı olarak usnik asit'in TNF- α , IL-6, IL-1 β ve iNOS ve COX-2 ekspresyonunu azalttığını bulmuşlardır [156].

Engel ve arkadaşları usnik asitin ana doğal kaynaklarından *Usnea Barbata* ekstraktını HACAT hücre hattında anti-inflamatuvar etkisini incelemişlerdir. Elde edilen verilere göre bu bitki ekstraktının COX-2 protein ekspresyon seviyelerini doza bağımlı olarak düşürdüğünü bulmuşlardır [157].

Parmelia saxatilis'den izole edilmiş usnik asitin, RAW-264.7 makrofaj hücre hattında TNF- α , IL-1 β and IL-6'nin yanı sıra TNF- α , iNOS ve COX-2 gen ekspresyonunu baskıladığı

gösterilmiştir. NF- κ B nükleer transkripsiyon faktörü, inflamasyon süreçte IL-1 β , TNF- α , iNOS ve COX-2 gibi çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenler [158].

C. monachoum etanol ekstraktı PGE₂ düzeylerini doza bağımlı olarak azaltmıştır. Alplerde yetişen 17 liken türünden elde edilen etanol ekstraktlarının antiinflamatuvar özellikleri incelenmiş ve düşük dozlarda bile PGE₂ seviyesini doza bağımlı olarak düşürdüğü bildirilmiştir [159].

Yaptığımız çalışmada meme kanseri hüclerine farklı konsantrasyonda usnik asit uygulaması PGE₂ düzeylerini konsantrasyona bağılı olarak % 5,79, % 22, % 31,54, % 42,24 % 58,63 azalttığı bulunmuş olup. Kontrol grubu ile usnik asit uygulanmış gruplar (Grup II dışında) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

Bilen ve ark., *Usnea barbata* likeni ekstraktını *Lactococcus garvieae* infeksiyonuna sahip alabalıkların tedavisinde ve immun sistem bağlantılı IL-8, TGF- β , IL-12 Beta, TNF- α , IL-10, COX-2, IL-6, TLR5, C3, IGM, MHC-II, iNOS, IgT, IFN1, IFN2 genlerinde çalışmışlardır. *Usnea barbata* likeni metanol ekstraktının antibiyotik yerine organik bir ürün olarak etkili bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır [160].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda;

- Usnik asitin MCF-7 meme kanseri hücre hattında antiproliferatif özellik gösterdiği gözlemlenmiştir.
- Kontrol ve usnik asit uygulaması yapılan hücrelerde NO düzeyleri incelendiğinde NO değerinin kontrol grubunda daha yüksek olduğu bu yüksekliğin usnik asit uygulanmış gruplarda doza bağımlı olarak azaldığı bu azalmanın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.
- Kontrol ve usnik asit uygulaması yapılan hücrelerde PGE₂ düzeyleri incelendiğinde PGE₂ değerinin kontrol grubunda daha yüksek olduğu bu yüksekliğin usnik asit uygulanmış gruplarda doza bağımlı olarak azaldığı bu azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- Kontrol ve usnik asit uygulaması yapılan hücreler TNF- α , düzeyleri açısından karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.
- Kontrol ve usnik asit uygulaması yapılan hücrelerde IL-6 düzeyleri incelendiğinde IL-6 değerinin kontrol grubunda daha yüksek olduğu bu yüksekliğin usnik asit uygulanmış gruplarda doza bağımlı olarak azaldığı bu azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- MCF-7 meme kanseri hücre hattında usnik asitin doza bağımlı olarak iNOS ve COX-2 gen ekspresyonunu düşürdüğü, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.
- Bu bilgilerin ışığında usnik asitin kanserli hücredeki inflamasyonu baskılayabileceği görülmüştür. Usnik asitin çeşitli formülasyonlarla meme kanserinde inflamasyonu baskılamak amacıyla kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. 09 Eylül 2019 tarihinde <https://hsgm.saglik.gov.tr/> adresinden erişildi.
- [2]. Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 21(6), 167-223.
- [3]. 09 Eylül 2019 tarihinde <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en> adresinden erişildi.
- [4]. Koo, M. M., von Wagner, C., Abel, G. A., McPhail, S., Rubin, G. P. et al. (2017). Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiology*, 48, 140-146.
- [5]. Ginsburg, O., Bray, F., Coleman, M. P., Vanderpuye, V., Eniu, A., Kotha, S. R. et al. (2017). The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *The Lancet*, 389(10071), 847-860.
- [6]. Weinstein, I. B. (1988). The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment—twenty-seventh GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer research*, 48(15), 4135-4143.
- [7]. Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Research*, 49(14), 3713-3721.
- [8]. Cohen, S. M., Ellwein, L. B. (1990). Cell proliferation in carcinogenesis. *Science*, 249(4972), 1007-1011.
- [9]. Kelsey, J. L., Bernstein, L. (1996). Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annual Review of Public Health*, 17(1), 47-67.
- [10]. Nandi, S., Guzman, R. C., Yang, J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(9), 3650-3657.
- [11]. Szabo, C. I., King, M. C. (1995). Inherited breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*, 4(suppl_1), 1811-1817.
- [12]. Daniel F. R. (2005). Breast Cancer. USA:Philadelphia
- [13]. Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y. et al. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387.
- [14]. 01 Ekim 2019 tarihinde <https://www.memekanseri.org.tr/meme-sagligi/meme-kanseri-risk-faktorleri> adresinden erişildi.
- [15]. Colditz, G. A., Kaphingst, K. A., Hankinson, S. E., and Rosner, B. (2012). Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast cancer research and treatment*, 133(3), 1097-1104.

- [16]. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L. et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77-106.
- [17]. Ritte, R., Lukanova, A., Berrino, F., Dossus, L., Tjønneland, A., Olsen, A. et al. (2012). Adiposity, hormone replacement therapy use and breast cancer risk by age and hormone receptor status: a large prospective cohort study. *Breast Cancer Research*, 14(3), R76.
- [18]. Ventura, S., Taffel, S. (2002). Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Breast Cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet*, 360(9328), 187-95.
- [19]. Sieri, S., Krogh, V., Bolelli, G., Abagnato, C. A., Grioni, S., Pala, V. et al. (2009). Sex hormone levels, breast cancer risk, and cancer receptor status in postmenopausal women: the ORDET cohort. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 18(1), 169-176.
- [20]. Barrett, R. (2019). *Diet, Physical Activity, and Sarcopenia among Women with Metastatic Breast Cancer*. Doktora tezi, Rush Üniversitesi, Chicago.
- [21]. Lahmann, P. H., Schulz, M., Hoffmann, K., Boeing, H., Tjønneland, A., Olsen, A. et al. (2005). Long-term weight change and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *British Journal of Cancer*, 93(5), 582-589.
- [22]. Milazzo, G., Giorgino, F., Damante, G., Sung, C., Stampfer, M. R., Vigneri, R. et al. (1992). Insulin receptor expression and function in human breast cancer cell lines. *Cancer Research*, 52(14), 3924-3930.
- [23]. Gunter, M. J., Hoover, D. R., Yu, H., Wassertheil-Smoller, S., Rohan, T. E., Manson, J. E. et al. (2009) Insulin, insulin-like growth factor-1, and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, 101(1), 48-60.
- [24]. Henderson, T. O., Amsterdam, A., Bhatia, S., Hudson, M. M., Meadows, A. T., Neglia, J. P. et al. (2010). Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Annals of Internal Medicine*, 152(7), 444-455.
- [25]. Guibout, C., Adjadj, E., Rubino, C., Shamsaldin, A., Grimaud, E., Hawkins, M. et al. (2005). Malignant breast tumors after radiotherapy for a first cancer during childhood. *Journal of Clinical Oncology*, 23(1), 197-204.
- [26]. Preston, D. L., Ron, E., Tokuoka, S., Funamoto, S., Nishi, N., Soda, M. et al. (2007). Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958–1998. *Radiation Research*, 168(1), 1-64.
- [27]. Pukkala, E., Kesminiene, A., Poliakov, S., Ryzhov, A., Drozdovitch, V., Kovgan, L. et al. (2006). Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *International Journal of Cancer*, 119(3), 651-658.

- [28]. Shah, R., Rosso, K., Nathanson, S. D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 283.
- [29]. Sant, M., Allemani, C., Capocaccia, R., Hakulinen, T., Aareleid, T., Coebergh, J. W. et al. (2003). Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe. *International Journal of Cancer*, 106(3), 416-422.
- [30]. Schwab, F. D., Huang, D. J., Schmid, S. M., Schötzau, A. ve Güth, U. (2015). Self-detection and clinical breast examination: Comparison of the two “classical” physical examination methods for the diagnosis of breast cancer. *The Breast*, 24(1), 90-92.
- [31]. Becker, S. (2015). A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 131, S36-S39.
- [32]. 01 Aralık 2019 tarihinde <http://www.sononukleer.com.tr/dijimamo.php> adresinden erişildi.
- [33]. 01 Aralık 2019 <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/breast-mri/about/pac-20384809> adrsinden erişildi.
- [34]. Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P. ve Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(2), 109.
- [35]. Yesha T., Muhammad A.T. and Azhar K. (2016). Prognosis, Prevalence Trend and Different Treatment Options of Breast Cancer in Pakistan. *Austin J Cancer Clin Research*, 3(1), 1066.
- [36]. Karakas, C. (2011). Paget's disease of the breast. *Journal of Carcinogenesis*, 10, 31.
- [37]. Waks, A. G., Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.
- [38]. Mitra, S., Dash, R. (2018). Natural products for the management and prevention of breast cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-23.
- [39]. Liao, G. S., Apaya, M. K. ve Shyur, L. F. (2013). Herbal medicine and acupuncture for breast cancer palliative care and adjuvant therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-17.
- [40]. Jones, P. A., Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692.
- [41]. Stearns, V., Zhou, Q. and Davidson, N. E. (2007). Epigenetic regulation as a new target for breast cancer therapy. *Cancer investigation*, 25(8), 659-665.
- [42]. Landis-Piwowar, K. R., Milacic, V. ve Dou, Q. P. (2008). Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 105(2), 514-523.
- [43]. Aggarwal, R., Jha, M., Shrivastava, A. and Jha, A. K. (2015). Natural compounds: role in reversal of epigenetic changes. *Biochemistry*, 80(8), 972-989.
- [44]. Chlebowski, R. T. (2014). Current concepts in breast cancer chemoprevention. *Pol Arch Med Wewn*, 124(4), 191-199.

- [45]. Ko, E. Y., Moon, A. (2015). Natural products for chemoprevention of breast cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 20(4), 223-231.
- [46]. Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Pezzi, V., Carpino, A., Marsico, S., Rago, V. et al. (2002). Aromatase overexpression enhances the stimulatory effects of adrenal androgens on MCF7 breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193(1-2), 13-18.
- [47]. Yarla, N. S., Bishayee, A., Sethi, G., Reddanna, P., Kalle, A. M., Dhananjaya, B. L. et al. (2016). Targeting arachidonic acid pathway by natural products for cancer prevention and therapy. In *Seminars in Cancer Biology* 40, 48-81.
- [48]. Sun, S. Y., Hail Jr, N. ve Lotan, R. (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(9), 662-672.
- [49]. Balkwill, F., Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The Lancet*, 357(9255), 539-545.
- [50]. Schmidt, A., Weber, O. F. (2006). In memoriam of Rudolf virchow: a historical retrospective including aspects of inflammation, infection and neoplasia. In *Infection and inflammation: impacts on oncogenesis* 13, 1-15.
- [51]. Norling, L. V., Serhan, C. N. (2010). Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *Journal of Internal Medicine*, 268(1), 15-24.
- [52]. Maeda, H., Akaike, T. (1998). Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry*, 63(7), 854-865.
- [53]. Shaked, H., Hofseth, L. J., Chumanovich, A., Chumanovich, A. A., Wang, J., Wang, Y. et al. (2012). Chronic epithelial NF- κ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 14007-14012.
- [54]. Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 7-30.
- [55]. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. ve Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- [56]. Singh-Ranger, G., Salhab, M. and Mokbel, K. (2008). The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 109(2), 189-198.
- [57]. Subbaramaiah, K., Telang, N., Ramonetti, J. T., Araki, R., DeVito, B., Weksler, B. B. and Dannenberg, A. J. (1996). Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Research*, 56(19), 4424-4429.
- [58]. Sheng, H., Williams, C. S., Shao, J., Liang, P., DuBois, R. N. ve Beauchamp, R. D. (1998). Induction of Cyclooxygenase-2 by Activated Haras Oncogene in Rat-1 Fibroblasts and the Role of Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 22120-22127.

- [59]. Vadlamudi, R., Mandal, M., Adam, L., Steinbach, G., Mendelsohn, J. ve Kumar, R. (1999). Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene*, 18(2), 305.
- [60]. Mestre, J. R., Subbaramaiah, K., Sacks, P. G., Schantz, S. P., Tanabe, T., Inoue, H. and Dannenberg, A. J. (1997). Retinoids suppress epidermal growth factor-induced transcription of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells. *Cancer Research*, 57(14), 2890-2895.
- [61]. Xie, W., Herschman, H. R. (1995). v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27622-27628.
- [62]. Xie, W., Herschman, H. R. (1996). Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31742-31748.
- [63]. Cotterchio, M., Kreiger, N., Sloan, M. ve Steingart, A. (2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10(11), 1213-1217.
- [64]. Kayaalp, O. (2012). *Tıbbi Farmakoloji*. 13. baskı. Ankara, s 1328-1330
- [65]. Nakanishi, M., Rosenberg, D. W. (2013). Multifaceted roles of PGE 2 in inflammation and cancer. In *Seminars in Immunopathology* 35(2), 123-137
- [66]. Wallace, J. L. (2001). Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics*, 30(4), 971-980.
- [67]. Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K. and Akira, S. (2002). Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E2 production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E2 synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5811-5816.
- [68]. Fischer, S. M., Hawk, E. T. and Lubet, R. A. (2011). Coxibs and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in animal models of cancer chemoprevention. *Cancer prevention Research*, 4(11), 1728-1735.
- [69]. Waddell, W. R., Ganser, G. F., Cerise, E. J. and Loughry, R. W. (1989). Sulindac for polyposis of the colon. *The American journal of surgery*, 157(1), 175-179.
- [70]. Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2003). Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E 2 administration. *Carcinogenesis*, 24(5), 985-990.
- [71]. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 9265-9269.
- [72]. Ignarro, L. J., Napoli, C. and Loscalzo, J. (2002). Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circulation Research*, 90(1), 21-28.

- [73]. Geller, D. A., Billiar, T. R. (1998). Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(1), 7-23.
- [74]. Quinn, A. C., Petros, A. J. and Vallence, P. (1995). Nitric oxide: an endogenous gas. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 74(4), 443-451.
- [75]. Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10), 907.
- [76]. Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(3), 593-615.
- [77]. Vannini, F., Kashfi, K. and Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biology*, 6, 334-343.
- [78]. Lala, P. K., Orucevic, A. (1998). Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(1), 91-106.
- [79]. 5 Kasım 2019 tarihinde http://www.who.int/cancer/events/breast_cancer_month/en/ adresinden erişildi.
- [80]. Loibl, S., von Minckwitz, G., Weber, S., Sinn, H. P., Schini-Kerth, V. B., Lobysheva, I. et al. (2002). Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Cancer*, 95(6), 1191-1198.
- [81]. Thomsen, L. L., Miles, D. W., Happerfield, L., Bobrow, L. G., Knowles, R. G. and Moncada, S. (1995). Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *British Journal of Cancer*, 72(1), 41.
- [82]. Jadeski, L. C., Hum, K. O., Chakraborty, C. and Lala, P. K. (2000). Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 86(1), 30-39.
- [83]. Switzer, C. H., Cheng, R. Y., Ridnour, L. A., Glynn, S. A., Ambs, S. and Wink, D. A. (2012). Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 14(5), R125.
- [84]. Zeillinger, R., Tantscher, E., Schneeberger, C., Tschugguel, W., Eder, S., Sliutz, G. ve Huber, J. C. (1996). Simultaneous expression of nitric oxide synthase and estrogen receptor in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, 40(2), 205-207.
- [85]. Pance, A. (2006). Nitric oxide and hormones in breast cancer: allies or enemies? *Future Oncol.* 2(2), 275-288.
- [86]. Mocellin, S., Bronte, V. and Nitti, D. (2007). Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Medicinal Research Reviews*, 27(3), 317-352.
- [87]. Nathan, C., Xie, Q. W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915-918.
- [88]. Koç, A. Y., (2011). *RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrik oksit sentezi üzerine L-karnitinin etkisi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

- [89]. Bloch, K. D., Wolfram, J. R., Brown, D. M., Roberts Jr, J. D., Zapol, D. G., Lepore, J. J. et al. (1995). Three members of the nitric oxide synthase II gene family (NOS2A, NOS2B, and NOS2C) colocalize to human chromosome 17. *Genomics*, 27(3), 526-530.
- [90]. Han, X., Zheng, T., Lan, Q., Zhang, Y., Kilfoy, B. A., Qin, Q. et al. (2009). Genetic polymorphisms in nitric oxide synthase genes modify the relationship between vegetable and fruit intake and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 18(5), 1429-1438.
- [91]. Zhang, L., Liu, Q., Yuan, X., Wang, T., Luo, S., Lei, H. and Xia, Y. (2013). Requirement of heat shock protein 70 for inducible nitric oxide synthase induction. *Cellular signalling*, 25(5), 1310-1317.
- [92]. Ganster, R. W., Taylor, B. S., Shao, L. and Geller, D. A. (2001). Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF- κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8638-8643.
- [93]. Kleinert, H., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I. and Förstermann, U. (1996). Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Molecular Pharmacology*, 49(1), 15-21.
- [94]. Janssen-Heininger, Y. M., Macara, I. and Mossman, B. T. (1999). Cooperativity between Oxidants and Tumor Necrosis Factor in the Activation of Nuclear Factor (NF)- κ B: Requirement of Ras/Mitogen-Activated Protein Kinases in the Activation of NF- κ B by Oxidants. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20(5), 942-952.
- [95]. Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C. and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric oxide*, 23(2), 75-93.
- [96]. Kotamraju, S., Williams, C. L. and Kalyanaraman, B. (2007). Statin-induced breast cancer cell death: role of inducible nitric oxide and arginase-dependent pathways. *Cancer Research*, 67(15), 7386-7394.
- [97]. Cauley, J. A., McTiernan, A., Rodabough, R. J., LaCroix, A., Bauer, D. C., Margolis, K. L. et al. (2006). Statin use and breast cancer: prospective results from the Women's Health Initiative. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(10), 700-707.
- [98]. Kanugula, A. K., Gollavilli, P. N., Vasamsetti, S. B., Karnewar, S., Gopaju, R., Ummanni, R. ve Kotamraju, S. (2014). Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms. *The FEBS Journal*, 281(16), 3719-3738.
- [99]. Jiang, J., Liu, J., Zhu, J., Yang, C. and Zhang, A. (2002). Mechanism of apoptotic effects induced by 5-fluorouracil on human liver carcinoma Bel7402 cell line. *Chinese Medical Journal*, 115(7), 968-971.

- [100]. Rao, C. V., Reddy, B. S., Steele, V. E., Wang, C. X., Liu, X., Ouyang, N. et al. (2006). Nitric oxide-releasing aspirin and indomethacin are potent inhibitors against colon cancer in azoxymethane-treated rats: effects on molecular targets. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(6), 1530-1538.
- [101]. Zhang, L., Liu, Q., Yuan, X., Wang, T., Luo, S., Lei, H. and Xia, Y. (2013). Requirement of heat shock protein 70 for inducible nitric oxide synthase induction. *Cellular Signalling*, 25(5), 1310-1317.
- [102]. Hussain, S. P., He, P., Subleski, J., Hofseth, L. J., Trivers, G. E., Mechanic, L. et al. (2008). Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis. *Cancer Research*, 68(17), 7130-7136.
- [103]. Shukla, V., Joshi, G. P. and Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9(2), 303-314.
- [104]. Abo-Khatwa, A. N., Al-Robai, A. A. and Al-Jawhari, D. A. (1996). Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. *Natural Toxins*, 4(2), 96-102.
- [105]. Ingolfssdottir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7), 729-736.
- [106]. Broksa, B., Sturdikova, M., Pronayova, N.ve Liptaj, T. (1996). -)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. *Die Pharmazie*, 51(3), 195.
- [107]. <https://wildflowerfinder.org.uk/Flowers/C/CladoniaPortentosa/CladoniaPortentosa.ht>
- [108]. 1 Kasım 2019 tarihinde <https://www.gaiaherbs.com/blogs/herbs/usnea> adresinden erişildi.
- [109]. 1 Kasım 2019 tarihinde [https://nl.wikipedia.org/wiki/Alectoria_\(schimmels\)](https://nl.wikipedia.org/wiki/Alectoria_(schimmels)) adresinden erişildi.
- [110]. Araújo, A. A. S., De Melo, M. G. D., Rabelo, T. K., Nunes, P. S., Santos, S. L., Serafini, M. R. et al. (2015). Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Natural Product Research*, 29(23), 2167-2180.
- [111]. Vartia, K. O. (1973). Antibiotics in lichens. *In The lichens* (547-561).
- [112]. Correche, E. R., Carrasco, M., Escudero, M. E., Velazquez, L., De Guzman, A. M. S., Giannini, F. et al. (1998). Study of the cytotoxic and antimicrobial activities of usnic acid and derivatives. *Fitoterapia*, 69(6), 493-501.
- [113]. Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I. and Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 567-579.
- [114]. Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F. and Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 333-343.
- [115]. Rabelo, T. K., Zeidán-Chuliá, F., Vasques, L. M., dos Santos, J. P. A., da Rocha, R. F., de Bittencourt Pasquali, M. A. et al. (2012). Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicology in Vitro*, 26(2), 304-314.

- [116]. Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M. and Kazaz, C. (2006). Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 59-65.
- [117]. Scalbert, A., Johnson, I. T. and Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 215S-217S.
- [118]. Kohlhardt-Floehr, C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J. and Truscott, T. G. (2010). Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation–Studies on human cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101(1), 97-102.
- [119]. Takai, M., Uehara, Y. and Beisler, J. A. (1979). Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 22(11), 1380-1384.
- [120]. Bézivin, C., Tomasi, S., Rouaud, I., Delcros, J. G. and Boustie, J. (2004). Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. *Planta Medica*, 70(09), 874-877.
- [121]. Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J. and Fedoročko, P. (2012). Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(3), 462-468.
- [122]. Brisdelli, F., Perilli, M., Sellitri, D., Piovano, M., Garbarino, J. A., Nicoletti, M. et al. (2013). Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytotherapy Research*, 27(3), 431-437.
- [123]. Karafakıoğlu Sunucu, Y. (2007). *Nonilfenol toksikasyonuna maruz bırakılan ratlarda taurinin malondialdehit, glutatyon, süperoksit dismutaz ve nitrik oksit üzerine etkilerinin araştırılması*, doktora tezi , Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar
- [124]. Stanojkovic T. (2015) Investigations of lichen secondary metabolites with potential anticancer activity. In: Rankovic B, editor. *Lichen Secondary Metabolites*, 127-141
- [125]. Saleem, M., Nazir, M., Ali MS, Hussain, H., Lee, YS., Riaz N, et al. (2010) Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep*, 27, 238-254.
- [126]. Singh, N., Nambiar, D., Kale, RK., Singh, RP. (2013) Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutr Cancer* 65, 36-43.
- [127]. Zuo, S., Wang, L., Zhang, Y., Zhao, D., Li, Q., Shao, D., et al. (2015) Usnic acid induces apoptosis via an ROS-dependent mitochondrial pathway in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *RSC Adv*. 5, 153-162.
- [128]. Kılıç, N., Değerli, E., Torun, V., Altaytaş, F., Cansaran-Duman, D. (2013). Investigation of synergistic effect of tamoxifen and usnic acid on breast cancer cell line. *Phytotherapy Research*, 27, 431-437.
- [129]. Mallavadhani, V., Vanga, NR., Balabhaskara, R, K., Jain, N. (2019). Synthesis and antiproliferative activity of novel (+)-usnic acid analogues. *Journal of Asian Natural Products research*, 1-16.

- [130]. Polat, Z., Aydın, E., Türkez, H., Aslan, A. (2016). In vitro risk assessment of usnic acid. *Toxicology and Industrial Health*, 32(3), 468-475.
- [131]. Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D., Kaplowitz, N., (2004). Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 67, 439–451.
- [132]. Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., et al. (2004). Prostaglandin E 2 promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor δ . *Cancer Cell* 6, 285–295. doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.011.
- [133]. Krysan, K., Reckamp, K. L., Sharma, S., and Dubinett, S. M. (2006). The potential and rationale for COX-2 inhibitors in lung cancer. *Anti Cancer Agents Med, Chem*, 6, 209–220. doi: 10.2174/187152006776930882
- [134]. Takaku, K., Sonoshita, M., Sasaki, N., Uozumi, N., Doi, Y., Shimizu, T., et al. (2000). Suppression of intestinal polyposis in Apc 1 716 knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A2. *Gene. J, Biol, Chem*, 275, 34013–34016. doi: 10.1074/jbc.C000586200
- [135]. Tiano, H. F., Loftin, C. D., Akunda, J., Lee, C. A., Spalding, J., Sessoms, A., et al. (2002). Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res.* 62, 3395–3401.
- [136]. Kawamori, T., Kitamura, T., Watanabe, K., Uchiya, N., Maruyama, T., Narumiya, S., et al. (2005). Prostaglandin E receptor subtype EP 1 deficiency inhibits colon cancer development. *Carcinogenesis*, 26, 353–357.
- [137]. Öhd, J. F., Nielsen, C. K., Campbell, J., Landberg, G., Löfberg, H., and Sjölander, A. (2003). Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 124, 57–70.
- [138]. Ding, X. Z., Talamonti, M. S., Bell, R. H. Jr., and Adrian, T. E. (2005). A novel anti-pancreatic cancer agent, LY293111. *Anticancer Drugs*, 16, 467–473.
- [139]. Paruchuri, S., Mezhybovska, M., Juhas, M., and Sjölander, A. (2006). Endogenous production of leukotriene D 4 mediates autocrine survival and proliferation via CysLT 1 receptor signalling in intestinal epithelial cells. *Oncogene*, 25(50), 6660
- [140]. Sharma, S., Stolina, M., Yang, S. C., Baratelli, F., Lin, J. F., Atianzar, K., et al. (2003). Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin, Cancer Res*, 9, 961–968.
- [141]. Attiq, A., Jalil, J., Husain, K. B., Ahmad, W. (2018). Raging the war against inflammation with natural products. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 976.
- [142]. Liu, H. E., Chang, A. S. Y., Teng, C. M., Chen, C. C., Tsai, A. C., Yang, C. R. (2011). Potent anti-inflammatory effects of denbinobin mediated by dual inhibition of expression of inducible NO synthase and cyclooxygenase 2. *Shock*, 35(2), 191-197.

- [143]. Chung, M. H., Kim, D. H., Na, H. K., Kim, J. H., Kim, H. N., Haegeman, G., Surh, Y. J. (2014). Genistein inhibits phorbol ester-induced NF- κ B transcriptional activity and COX-2 expression by blocking the phosphorylation of p65/RelA in human mammary epithelial cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 768, 74-83.
- [144]. Sinha, D., Sarkar, N., Biswas, J., & Bishayee, A. (2016). Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *In Seminars in Cancer Biology*, 40, 209-232.
- [145]. Lu, W., Lin, C., King, T. D., Chen, H., Reynolds, R. C., Li, Y. (2012). Silibinin inhibits Wnt/ β -catenin signaling by suppressing Wnt co-receptor LRP6 expression in human prostate and breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 24(12), 2291-2296.
- [146]. Kim, S., Kim, S. H., Hur, S. M., Lee, S. K., Kim, W. W., Kim, J. S., Yang, J. H. (2009). Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression by down-regulation of COX-2 in human breast cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(2), 252-257.
- [147]. Zeybek, N. D., Inan, S., Ekerbicer, N., Vatansever, H. S., Karakaya, J., Muftuoglu, S. F. (2011). The effects of Gemcitabine and Vinorelbine on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) distribution of MCF-7 breast cancer cells. *Acta Histochemica*, 113(1), 62-67.
- [148]. Crowell JA, Steele VE, Sigman CC, Fay JR. (2003) Is inducible nitric oxide synthase a target for chemoprevention?. *Mol Cancer Ther*, 2(8) 815–823.
- [149] Oktem, G., Karabulut, B., Selvi, N., Sezgin, C., Sanli, U. A., Uslu, R., Omay, S. B. (2004). Differential effects of doxorubicin and docetaxel on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 14(7-8), 381-386.
- [150] Kumar, S., Kashyap, P. (2015). Antiproliferative activity and nitric oxide production of a methanolic extract of *Fraxinus micrantha* on Michigan Cancer Foundation-7 mammalian breast carcinoma cell line. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(2), 109.
- [151]. Rezakhani, L., Rashidi, Z., Mirzapour, P., Khazaei, M. (2014). Antiproliferatory effects of crab shell extract on breast cancer cell line (MCF7). *Journal of Breast Cancer*, 17(3), 219-225.
- [152]. Costantini, S., Romano, G., Rusolo, F., Capone, F., Guerriero, E., Colonna, G., Costantini, M. (2015). Anti-inflammatory effects of a methanol extract from the marine sponge *Geodia cydonium* on the human breast cancer MCF-7 cell line. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1-9.
- [153]. Jin, J. Q., Li, C. Q., He, L. C. (2008). Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor- κ B-dependent tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(12), 1605-1609.

- [154]. Vijayakumar, C. S., Viswanathan, S., Reddy, M. K., Parvathavarthini, S., Kundu, A. B., Sukumar, E. (2000). Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*, 71(5), 564-566.
- [155]. Su, Z. Q., Mo, Z. Z., Liao, J. B., Feng, X. X., Liang, Y. Z., Zhang, X. ve et al. (2014). Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. *International Immunopharmacology*, 22(2), 371-378.
- [156]. Huang, Z., Zheng, G., Tao, J., & Ruan, J. (2011). Anti-inflammatory effects and mechanisms of usnic acid. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 26(5), 955-959.
- [157]. Engel, K., Schmidt, U., Reuter, J., Weckesser, S., Simon-Haarhaus, B., & Schempp, C. M. (2007). Usnea barbata extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 89(1), 9-14.
- [158]. Huang, Z., Tao, J., Ruan, J., Li, C., Zheng, G. (2014). Anti-inflammatory effects and mechanisms of usnic acid, a compound firstly isolated from lichen Parmelia saxatilis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(4), 197-207.
- [159]. Studzińska-Sroka, E., Dubino, A. (2018). Lichens as a source of chemical compounds with anti-inflammatory activity. *Herba Polonica*, 64(1), 56-64.
- [160]. Bilen, S., Sirtiyah, A. M. A., and Terzi, E. (2019). Therapeutic effects of beard lichen, Usnea barbata extract against Lactococcus garvieae infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 401-409.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Metin Yıldırım

Doğum Tarihi : 30. 06.1988

E-mail : metinyildirim4@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya	Mersin Üniversitesi	2006-2011
Yüksek Lisans	Eczacılık Biyokimya	Mersin Üniversitesi	2012-2015
Yüksek Lisans	Farmasotik Teknoloji	Mersin Üniversitesi	2015-2017
Doktora	Eczacılık Biyokimya	Mersin Üniversitesi	2015-2019

ESERLER

1. Berköz M ,Yıldırım M, Bora G, Türkmen Ö, Allahveriev O, Effect of capsaicin on transcription factors n 3T3-L1 cell line Eastern Journal of Medicine 2015.
2. Ozkan-Yilmaz, F Ozluer-Hunt, A Gunduz, SG., Berkoz, M Yalin S., Yildirim, M. Effects of Fenbutatin Oxide on Antioxidant System of Different Tissues in Cyprinus Carpio (L., 1758) Fresenius Environmental Bulletin 26(10) 6141-6148 2017.
3. Yaman, S.; Çömelekoğlu, Ü.; Değirmenci, E.; Karagül, M.; Yalın, S.; Ballı, E.; Yıldırımcan, S.; Yıldırım, M.; Doğaner, A.; Ocañoğlu, K. Effects of silica nanoparticles on isolated rat uterine smooth muscle, Drug and Chemical Toxicology, 41:4, 465-475, DOI: 10.1080/01480545.2017.1384005
4. Berköz M., Arslan B., Yıldırım M., Aras N., Yalın S., Çömelekoğlu Ü. 1800 MHz radio-frequency electromagnetic radiation induces oxidative stress in rat liver, kidney and brain tissues. Eastern J Med. 2018; 23(2): 71-78
5. Allahverdiyev O., Dzhafer S., Berköz M., Yıldırım M. Advances in current medication and new therapeutic approaches in epilepsy. Eastern J Med. 2018; 23(1): 48-59
6. Berköz M., Allahverdiyev O., Yıldırım M. Investigation of the effect of hyperforin and hypericin on inflammatory response in RAW 264.7 macrophages. Van Med J. 2018; 25(2): 124-131
7. Ozkan-Yilmaz F., Su Z., Ozluer-Hunt, A., Yildirim, M., Yalin S Protective Effect of Humic Substances Against Oxidative Stress Caused by Lead in Liver of Nile Tilapia, Oreochromis

- niloticus (Linnaeus, 1758) Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 6(8): 1015-1021, 2018
8. Eker ED, Arslan B, Yıldırım M, Akar A, Aras N The Effect of Exposure to 1800 MHz Radiofrequency Radiation on Epidermal Growth Factor, Caspase-3, Hsp27 and p38MAPK Gene Expressions in The Rat Eye Bratisl Lek Listy. 2018;119(9):588-592
 9. Çömelekoğlu, Ü. Aktas S., Demirbag B., Karagül Mİ., Yalın S., Yıldırım M., Akar A Engiz BK. Sogut F., Ozbay E., Effect of low-level 1800 MHz radiofrequency radiation on the rat sciatic nerve and the protective role of paricalcitol Bioelectromagnetics. 2018 Oct 16. doi: 10.1002/bem.22149
 10. Özkan-Yılmaz, F , Özlüer-Hunt, A , Berköz, M , Yıldırım, M . "Investigation of Glutathion S-Transferase, Adenosine deaminase, Paraoxonase Activities in Liver of Oncorhynchus mykiss Fed with Nucleotide-Yeast Supplemented Diet". Natural and Engineering Sciences 3 (2018): 300-310
 11. Berköz, M., Yıldırım, M., Krosniak M., Francik R., Allahverdiyev O Antioxidant activity of different extracts from stalk part of rhubarb (*Rheum rhabarbarum* L.) VAN HEALTH SCIENCES JOURNAL,2(11) 15-20, 2019
 12. Berköz, M , Özkan-Yılmaz, F , Özlüer-Hunt, A , Yıldırım, M . Allahverdiyev O., Aslan A. *Rosa Canina* L. Ethanolic Extract Induces The Anti-proliferative and Apotosis Potential in MCF-7 And MDA-MB-468 Cell Lines Fresenius Environmental Bulletin 28(5) 3718-3723,2019
 13. Berköz, M ., Özkan-Yılmaz, F , Özlüer-Hunt, A , Gunduz GS, Yıldırım, M., Yalın S. Influence of Sublethal Chlorpyrifos Exposure On Oxidative Stress And Acetylcholinesterase Activity In Common Carp (*CYPRINUS CARPIO*) Fresenius Environmental Bulletin 28(6) 4642-4649,2019
 14. Berköz, M., Kahraman T., Yıldırım, M., Yigit MF. Allahverdiyev O. Hepatoprotective Effect Of *Nigella Sativa* L. Extract In Methyl Parathion Exposed Rats Fresenius Environmental Bulletin ,2019
 15. Yıldırım M., Değirmenci U., Yalın S. Epilepside İnflamasyonun Rolü Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi,2019
 16. Krośniak, M., Szklarzewicz, J., Gryboś, R., Tatar, B., Yildirim, M., Sahin, B., ... & Ustundag, M. (2019). The influence of chronic supply of vanadium compounds on organ weights and body mass in animal diabetes model (NZO). Science, Technology and Innovation, 4(1), 63-73.
 17. Özlüer-Hunt, A., Cetinkaya M., Özkan-Yılmaz, F., Yıldırım, M, Berköz, M , Yalın S. Effect of Dietary Supplementation of Inulin on Growth Performance, Digestion Enzyme Activities and Antioxidant Status of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 7(9): 1344-1353, 2019

18. Barlaz Us, S., Sogut, F., Yıldırım, M., Yetkin, D., Yalin, S., Yilmaz, S. N., & Comelekoglu, U. (2019). Effect of Imipramine on radiosensitivity of Prostate Cancer: An In Vitro Study. *Cancer Investigation*, 1-12.
19. Kahraman T., Berköz, M., Allahverdiyev O. Mahmood EA., Yıldırım, M., Yalin S. Can *Juniperus communis L.* oil improve nephropathy in diabetic rats *Clinical and Experimental Health Sciences* DOI: 10.33808/clinexphealthsci.543272 ,2019

