



Parietin HepG2 Hepatoselüler Karsinom Hücrelerinde Sitotoksik ve Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Alper Kürşat DEMİRKAYA^{1a}, Gülşah GÜNDOĞDU^{2b}✉, Yavuz DODURGA^{3c}, Mücahit SEÇME^{3d}, Köksal GÜNDOĞDU^{4e}

1. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Bilecik, TÜRKİYE.
 2. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
 3. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, TÜRKİYE.
 4. Erzurum Bölge Eğitim Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
- ORCID: 0000-0002-7994-7832^a, 0000-0002-9924-5176^b, 0000-0002-4936-5954^c, 0000-0002-2084-760^d, 0000-0001-6820-5625^e

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
31.01.2018	14.08.2018	28.04.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Demirkaya AK, Gündoğdu G, Dodurga Y, Seçme M, Gündoğdu K: Parietin HepG2 Hepatoselüler Karsinom Hücrelerinde Sitotoksik ve Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(1): 29-37, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.387311

Öz: Hepatoselüler karsinom (HCC) karaciğer hücrelerinden köken kansere bağlı ölümlerde de üçüncü sırada yer alan malign kanser türüdür. Parietin genellikle ışkın (*Rheum ribes* L.) gibi bazı bitkilerden izole edilen bir antrakinondur. Sitotoksik ve genotoksik testler karsinojenik ve kalıtsal risklerin değerlendirilmesinde önemli testlerdir. Bu çalışmada parietinin HepG2 hepatoselüler karsinom hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. HepG2 hücreleri uygun koşullarda kültüre edildi. Daha sonra hücrelere 25-1000 µM aralığında konsantrasyonda parietin uygulanarak 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücre canlılık oranı XTT yöntemi ile doza ve zamana bağlı olarak belirlendi. Genotoksik etkisi ise komet yöntemi ile belirlendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Parietin HepG2 hücrelerine IC50 değeri 48. saatte 25 µM olarak belirlendi. Komet analiz sonuçlarına göre DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti gibi parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmedi ($p>0.05$). Bu çalışmada, parietinin HepG2 hücrelerinde düşük konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdiği fakat genotoksik etki göstermediği gösterilmiştir. Sonuç olarak parietin, hepatoselüler karsinom tedavisinde diğer ilaçlarla birlikte kombine olarak faydalı bir ajan olabileceği öngörülmekle birlikte ve yapılacak olan daha detaylı çalışmalarla da desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: HepG2 hücre hattı, Komet Analizi, Parietin.

Determination of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Parietin in HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cells

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) originating from liver cells is the third leading cause of cancer-related death. Parietin is an anthraquinone, isolated from some plants such as *Rheum ribes* L. Cytotoxicity and genotoxicity tests have an important role in the assessment of heritable and carcinogenic risks. In this study, it was aimed to investigate the cytotoxic and genotoxic effect of parietin on HepG2 hepatocellular carcinoma cells. HepG2 cells were cultured in appropriate culture medium. Then, different concentrations of parietin (final concentrations in the well to be 25-1000 µM) were added to the cells and they were allowed to incubate for 24-48 hours. Cell viability and genotoxic effect were determined by using XTT method and comet assay, respectively. The IC50 concentration of parietin was detected as 25 µM at the 48 hour in HepG2 cells. According to the comet assay, there was no statistically significant increase DNA tail length, DNA tail intensity and DNA tail moment in parietin treated cell groups compared to control groups ($p>0.05$). In this study, it has been shown that parietin has cytotoxic at low dose, but has not genotoxic effect in HepG2 cells, and as a result parietin was found to be useful in combination with other drugs in the treatment of HepG2 cells. However, this effect of parietin should be supported by further studies.

Keywords: Comet Assay, HepG2 cell line, Parietin.

✉Gülşah Gündoğdu
Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: gdemirkaya81@gmail.com

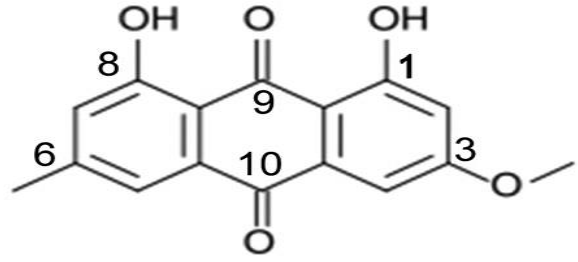
GİRİŞ

Kanser artan teşhis ve tedavi yöntemlerine rağmen başta gelişmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyada en önemli sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalıklara bağlı ölümler içinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla ikinci ölüm oranına sahip olan kanser, sık görülmesi ve yol açtığı ölümler sebebiyle büyük bir halk sağlığı sorunu olarak değerlendirilmektedir (1). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 yılında yayınlamış olduğu "Kanserde Erken Teşhis Rehberi" raporunda, kansere bağlı ölümlerin temel sebebinin teşhiste yaşanan gecikmeler olduğunu ve aynı zamanda etkili tedavinin önemine vurgu yapılmıştır (2). Dünya Sağlık Örgütü'nün Türkiye ile ilgili yayınlamış olduğu bilgilere göre kansere bağlı ölümlerde 2000 yılında 89.4 bin olan hayatını kaybeden insan sayısının 2015 yılında 103.7 bine yükselerek %16 civarında arttığı bildirilmiştir (3). Kanser, diğer hastalıklarla karşılaştırıldığında kendini göstermesi, ilerlemesi ve sebep olduğu sonuçlar bakımından değişkenlik gösteren, genetik, kimyasal ve çevresel koşulların etkisiyle tetiklenen, hücrelerin kontrolsüz ve aşırı çoğalmaları, uzaktaki doku ve organlara metastaz yapmaları ile karakterize olan karmaşık bir hastalıktır (4). Kanser, genellikle tümör baskılayıcı genlerdeki inaktivasyon, onkogenlerdeki aktivasyon hücre bölünmesini kontrol eden genlerde ve DNA hasarının tespiti ve onarımında görev alan genlerde meydana gelen mutasyon veya anormal değişim sonucu oluşmaktadır (5). Normal hücrelerden anormal karakterli kanser hücresine dönüşüm için geçen süreç karsinogenez olarak isimlendirilir ve süreçte bazı temel hücresel değişikliklerde gözlemlenebilmektedir. Bunlar arasında, büyüme sinyalleri yönünden kendi kendine yeterlilik, büyüme baskılayıcı sinyallere karşı duyarsızlık, programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, doku istilası olarak bilinen invazyon yeteneği ve metastaz ile sürekli anjiyogenez sayılabilir (6,7). Kanser tedavisinde tespit edilen tümörün bulunduğu doku, karakteri ve

evresi ile hastanın fizyolojik durumuna göre çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Bunlar arasında, kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi, monoklonal antikor terapileri, genetik terapi ve cerrahi müdahale gibi yöntemler bulunmaktadır (8,9). Günümüzde tıp ve teknolojiye gelişmeler kapsamında teşhis ve tedavide artan imkânlarla rağmen kanser ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Hepatoselüler karsinoma, dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında üçüncü sırada yer alan bir kanser türüdür (10). Kemoterapi, cerrahi müdahale, rezeksiyon ve organ nakli gibi konvansiyonel tedavilerdeki başarı oranının çok yüksek olmaması, hastalığın nüksetmesi ve aynı zamanda tedavi kapsamında ortaya çıkan yan etkiler nedeniyle toksik etki göstermeyen ve etki mekanizması, biyoyararlanımı ve metabolizması tam anlamıyla aydınlatılmış bitkisel kökenli biyomoleküllerin tespiti ile tedavi aranması çalışmaları devam etmektedir (11-13). Hepatoselüler karsinomun oluşumunda ve gelişiminde genetik ve epigenetik olayların birikmesi sonucu oluşan kompleks ve çok aşamalı bir sürecin rol aldığı düşünülmektedir (14).

Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerdeki geleneksel ilaçların üretimi ve kullanımı giderek yaygınlaşmakta olup bu durum artan bir ticari potansiyel oluşturmuştur (15). Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlamış olduğu raporda 1970'li yıllardan bu yana yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kanserden korunma noktasında beslenme ve diyetin oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır (3). Bu doğrultuda, meyve sebze ağırlıklı beslenme ve diyetin kolon, akciğer özafagus, mide, akciğer, karaciğer ve rektum kanserlerine yakalanma riski ile ters orantı olduğu rapor edilmiştir (16,17). Son yıllarda yapılan çalışmalar programlı hücre ölümü ve hücre döngüsünü düzenleyen onkogen ve tümör baskılayıcı genler üzerinde hepatokarsinogenez arasındaki ilişki üzerine odaklanarak tedaviye katkı sağlamaya ve yeni biyobileşiklere odaklanmaktadır (18). Eski tarihlerden

bu yana bitkiler ve likenler pek çok ülkede tıbbi amaçlı olarak geleneksel tedavi kapsamında ilaç olarak kullanılmıştır (19). Likenler, alg ve mantarların beraber bir araya gelerek oluşturdukları morfolojik ve fizyolojik birliktelik olarak bilinmektedir (20). Likenlerin sahip olduğu stistik asit, giroforik asit ve norstistik asit gibi sekonder metabolitler sayesinde tedavi etkiye sahip olduğu ve günümüzde de bu metabolitlerin kanser, artrit, diyabet, egzema, solunum ve dolaşım yolu gibi bazı hastalıklarda tedavi edici ajan olarak kullanımına yönelik çalışmalar mevcuttur (21,22). Mantar ve alglerin simbiyotik birlikteliği ile oluşan likenler, pek çoğu likenlere özgü olan çeşitli metabolitler sentezlemektedir (20,23). Liken sekonder metabolitlerinin antibakteriyal, antiviral, antioksidan ve antikanserojen olmak üzere pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve bu metabolitlerin tıbbi ve biyoteknolojik özellikleri nedeniyle tedavi amaçlı aday moleküller olabileceğine dair çalışmalar ortaya yapılmaktadır (24). Parietin, *Xanthoria parietina* gibi liken türlerinden elde edilen sekonder metabolit olup bir antrakinon pigmentidir (Şekil 1). Bu pigment likenlerin üst korteksinin en üst seviyesinde yer alan küçük ekstraselüler kristaller olarak lokalizedirler ve güneş ışınlarına karşı güçlü bir turuncu-kahverengimsi renk vermesinden dolayı koruyucu bir rol üstlenirler (25-27). Çeşitli çalışmalarda parietinin antifungal ve antibakteriyal aktiviteleri gösterilmiştir. Ayrıca, parietinin çeşitli kanser tiplerinde apoptozu indükleyerek anti-kanserojen etki gösterdiği rapor edilmiştir (28,29). Literatürde parietinin hepatoselüler karsinom hücreleri üzerinde antikanser mekanizmasını inceleyen bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle çalışmada *Rheum ribes* L'den izole edilen parietinin hepatoselüler karsinom hücreleri olan HepG2 hücre hattında sitotoksik ve genotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 1. Parietinin (1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methyl- 9,10-anthraquinone) yapısı (30).

Figure 1. Structure of parietinin (1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methyl- 9,10-anthraquinone) (30).

MATERYAL ve METOT

Çalışmada, Fötal Sığır Serum (Sıcaklık ile inaktive edilmiş) (Biological Industries), Kristal Viyole (BioShop), Hoechst (Sigma), Penisilin/Streptomisin (Biological Industries), Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Biological Industries), Phosphate buffered saline (PBS) (Biological Industries), Tripan Mavis Boyası (%0.5 (w/v) fizyolojik tuz içinde), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Roche) (Santa Cruz), DNAaz/RNAse free su (Invitrogen), Steril kültür kapları (Petri), (Greiner) 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Greiner) 96-Kuyucuklu PCR Array Plate (Qiagen) XTT proliferation Kit (Biological Industries), yüksek ve düşük erime noktalı Agaroz [Lonza, Sea Plaque®Agarose, İsviçre), Histopak-1077 (Sigma Aldrich®, ABD), Metanol (Sigma Aldrich®, ABD), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Fischer BioReagents®, ABD)'den sağlanan kimyasallar ve kitler kullanıldı. Parietin, *Rheum ribes* L. bitkisinden izole edildi. İn vitro koşullarda HepG2 hücre hattı kullanıldı ve hücreler %10 fötal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin ve 10mg/mL streptomisin içeren DMEM besiyerinde %5 CO₂ ve 37°C'e sıcaklıkta etüvde inkübe edildi. Daha sonra parietinin HepG2 hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için, farklı konsantrasyonlarda parietin (25µM–1000µM) uygulanarak 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit analiz yöntemi ile hücre canlılığı

(sitotoksosite durumu) ve hücrelerin %50'nin yaşadığı doz değerlendirildi.

XTT Analizi

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan XTT analiz yöntemi ile belirlendi. Çalışma üretici firmanın kit protokolüne göre yapıldı. Bu test suda eriyebilen bir bileşik olan XTT 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'yi canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibine göre işlemektedir. Formazan absorpsansı ELISA reader (MicroQuant, Reader, BioTek, Winooski, VT, USA) ile 450nm dalga boyunda ve 630nm referans aralığında değerlendirildi. Ölçülen optik dansite değeri aşağıdaki formül kullanılarak doza ve zamana bağlı olarak tespit edildi.

$\% \text{ Hücre Canlılığı} = (\text{Ölçülen optik dansite değeri}) / (\text{Kontrol optik dansite değeri}) \times 100$

Komet Analizi

HepG2 hücrelerinde parietinin genotoksik etkisini belirlemek için komet yöntemi kullanıldı. XTT yönteminde tespit edilen parietinin IC₅₀ dozu ve kontrol hücreleri 6 well plakalara her bir plakada 2x10⁵ hücre olacak şekilde ekildi. IC₅₀ doz süresi sonucunda plakalardan hücreler toplandı ve komet analizi için kullanıldı. Deney öncesi lamlar %1.8'lik yüksek erime noktalı agaroz (HMA) çözeltisine maruz bırakılarak hazırlandı. Deney günü hücre ve düşük erime noktalı agaroz (LMA) karışımı lamlara damlatılıp, üzeri lamellerle kapatıldı ve agarozun katılaşması için buzdolabında bekletildi. Süre sonunda lameller çıkarılıp lizis çözeltisinde bekletildi ve sonra lamlar yıkanarak uygun akım, süre ve sıcaklıkta (1V/cm, 300mA, 20 dakika, 4°C) elektroforez aşaması gerçekleştirildi. Lamlar distile su ile yıkanıp sırayla nötralizasyon çözeltisi ve metonelde bekletildi. Hazır hale gelen preparatlar etidyum bromür ile boyandı ve Comet Assay IV Version 4.3.2 for Basler FireWire görüntü analiz programı kullanılarak Floresan Mikroskop (Nikon)

yardımıyla görüntü analizi gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda kontrol ve doz grubu hücrelerin DNA kuyruk uzunluğu, DNA kuyruk yoğunluğu, DNA baş uzunluğu ve yoğunluğu DNA kuyruk momenti değerleri incelendi.

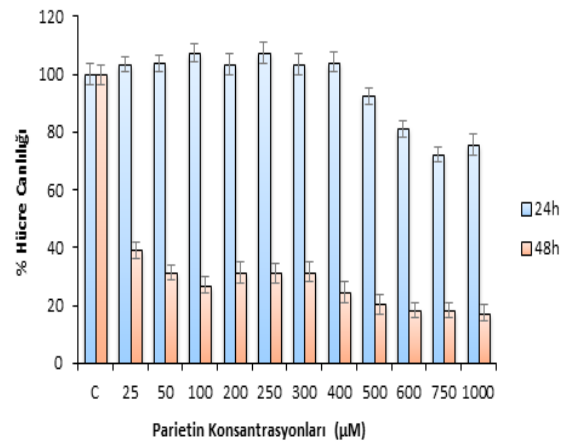
İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma student-t testi kullanılarak hesaplandı. Tüm hesaplamalar, istatistiksel analiz için SPSS 24 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel önemi göstermek için P<0.05 değerleri dikkate alındı.

BULGULAR

XTT Testi ile Sitotoksite Sonuçları

Parietinin HepG2 hepatoselüler karsinom hücrelerinde 24 ve 48. saatlerde 25 µM ve 1000µM arasındaki dozlarda hücre canlılığı üzerine olan etkisi ve IC₅₀ dozu belirlendi (Şekil 2). Bu kapsamda parietinin HepG2 hücrelerinde IC₅₀ dozu 48. saatte 25 µM olarak tespit edildi. Parietin HepG2 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edildi.

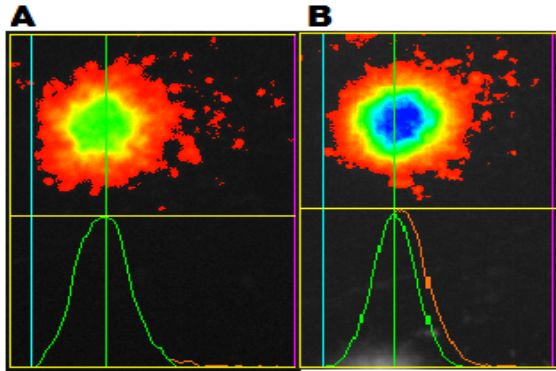


Şekil 2. HepG2 hücrelerinde çeşitli konantrasyonlardaki parietinin sitotoksik etkileri [C: kontrol (Herhangi bir madde ile tedavi edilmemiş hücre)].

Figure 2. The cytotoxic effects of parietin at various concentrations in HepG2 cell line [C: control (untreated cells)].

Komet Testi ile Genotoksosite Sonuçları

HepG2 HCC hücre hattında parietinin DNA hasar ve genotoksitesini belirlemek için komet yöntemi kullanıldı. Çalışmada parietinin IC₅₀ dozu (48 saat için 25µM) kullanıldı. Komet yöntemi ile tedavi uygulanmamış kontrol hücreleri yuvarlak görünümünde iken, parietin uygulanan hücrelerde bir miktar kuyruk görüntüsü izlendi (Şekil 3).



Şekil 3. Komet yöntemi görüntüsü: A: Normal, tedavi edilmemiş HepG2 hücreleri; B: 48 saat süreyle 2 µM parietin ile tedavi edilen HepG2 hücreleri.

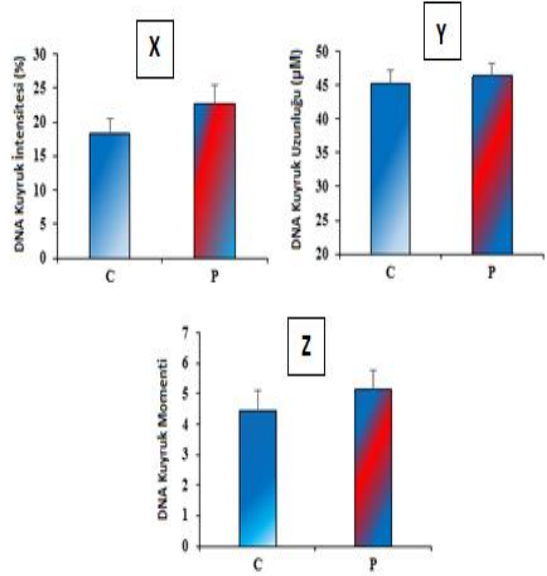
Figure 3. Comet assay images: A. Normal, untreated HepG2 cell; B. HepG2 cells treated with 25µM parietin for 48 hours.

Komet yöntemi sonuçlarına göre (Şekil 4), 48 saat süreyle 25µM parietin ile tedavi edilen HepG2 hücrelerde kontrol hücrelerine göre (normal, tedavi edilmemiş HepG2 hücreleri) DNA kuyruk intensitesi,

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada parietin adı verilen liken ve bitkisel metabolitin HepG2 hepatosellüler kanser hücrelerinde anti-proliferatif ve genotoksik etkinliği araştırılmıştır. HepG2 hücrelerinde hücre proliferasyonunun durdurduğu tespit edilmiş ve parietinin IC₅₀ dozu 48. Saatte 25µM olarak belirlenmiştir. Parietinin genotoksik etkisinin belirlenmesi için yapılan komet yönteminde ise kontrol grubu ve parietin muamele edilen grup arasında DNA kuyruk uzunluğu, DNA kuyruk yoğunluğu ve DNA kuyruk momenti gibi parametrelerde istatistiksel olarak herhangi bir

DNA kuyruk uzunluğu ve DNA kuyruk momentinde artış tesbit edildi, bu artış istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmedi (P>0.05).



Şekil 4. 48 saat süre ile 25µM parietin ile tedavi edilen HepG2 hücrelerinin komet parametreleri. X: DNA kuyruk intensitesi, Y: DNA kuyruk uzunluğu, Z: DNA kuyruk momenti. [n=55, P>0.05; C: kontrol (tedavi edilmemiş hücre), P: 25µM Parietinin ile tedavi edilmiş hücre].

Figure 4. Comet parameters of HepG2 cells were treated with 25µM parietin for 48 hours. X: DNA tail intensity, Y: DNA tail length, Z: DNA tail moment. [n=55, P>0.05; C: control (untreated cells), P: cells treated with 25µM parietin].

anlamlılık tespit edilememiştir. Bu sonuç, düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu azaltan parietinin bu hücrelerde genotoksik bir aktivite sergilemediği ve yapılacak olan çalışmalarda etkili bir ajan olabileceğini göstermiştir. Günümüzde sekonder metabolitlerin flavonoidlerin, fenolik bileşiklerin ve benzer biyomoleküllerin biyoyararlanımları ve etki mekanizmaları hakkında çalışmalar yapılmakla birlikte insanlardaki metabolik dönüşümleri göz ardı edildiğinden sağlık üzerine olan etkileri tam anlamıyla belirlenmemiştir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda bu bileşiklerin biyoaktiviteleri arasında farklılıkların olduğu yönünde sonuçlar rapor edilmesi

nedeniyle, araştırılan bu bileşiklerin biyoaktivite tespitleri için biyoyararlanımları, emilimleri ve metabolizmalarının net olması önem arz etmektedir. Bununla birlikte sekonder metabolitler antikanserojen, antibakteriyal, antifungal, antiviral, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-diyabetik, hepatoprotektif faaliyetler gibi önemli güçlü biyolojik aktivite ve özelliklere sahiptirler (31-33). Ülkemizde ve tüm dünyada bitkisel bileşiklerin farmasötik özelliklerinden faydalanılarak halk arasında tamamlayıcı tedavi kapsamında tıbbi yönlerinden faydalanılmıştır. Likenlerden de elde edilen pek çok metabolik bileşik bu amaçla kullanılmaktadır. Liken metabolitleri ile yapılan çalışmalarda tümör hücrelerine karşı anti-proliferatif etki gösterdiğine yönelik çeşitli araştırmalar olsa da mevcut veriler oldukça kısıtlıdır (20). Bununla birlikte, Liken sekonder metabolitlerinden usnik asit [2, 6 -diasetil - 7, 9 – dihidroksi - 8, 9 b – dimetil - 1, 3 (2H9bH) dibenzofurandion], anti-tümöral etkinliği ve insan meme adenokarsinom hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde, HTC-116 insan kolon adenokarsinomunda ve HeLa serviks kanseri hücrelerinde anti-proliferatif etkisi tespit edilmiştir (34). Bu bileşiğin A549 akciğer adenokarsinom hücre hatlarında G0/G1-siklin D1 siklin-bağlı kinazlar (CDKs) ve siklin-bağlı kinaz inhibitör (CDK1) protein ifade düzeyi üzerinde hücre döngüsünün durdurulmasını ve mitokondriyal membran potansiyelini etkileyerek apoptozu indükleyerek hücre büyümesinin inhibe ettiği bildirilmiştir (35). Bir diğer bileşik olan Atranorin sekonder metaboliti ile yapılan in vitro anti-tümöral etki çalışmalarında insan ovariyum A2780, HT-29 kolon kanseri, LNCaP ve DU-145 prostat kanser hücrelerinde sitotoksik etki göstererek apoptozu sürüklediğine yönelik sonuçlar elde edilmiştir (28,36). Galanty ve ark. (37), tarafından yapılan çalışmada Usnic acid ve atranorin melanoma HTB-140, prostate cancascid-145 ve PC-3 hücrelerinde de sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Basile ve ark. (38), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, bir liken türü olan *Xanthoria parietina*'dan izole edilen parietinin aseton ekstraktının antifungal, antimikrobiyal etki gösterdiği

ve hücre proliferasyonunun da azalttığı ortaya koyulmuştur. MCF-7 ve MDA-MB231 insan meme kanseri hücre hatlarında parietinin hücre çoğalmasını durdurduğu ve apoptozu indüklediği ve bunu da hücre döngüsünün regülasyonunda görev alan p16, p27, siklin D1 ve siklin A gibi genlerin ekspresyonunu azaltarak ve ayrıca iç ve dış apoptotoik yollarda görev alan TRAIL ve Bcl-2 gibi genlerin ekspresyonlarını değiştirerek yaptığı gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada parietinin in vitro fotodinamik antibakteriyal etki gösteren bir etkili foto-tarama pigmenti olduğu belirtilmiştir (25). Triggiani ve ark. (39), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada parietin içeren *Xanthoria parietina* ekstraktının fare miyelom hücrelerinde (P3X63Ag8.653) hücre proliferasyonunu %75 oranında düşürerek ve hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı belirtilmiştir. A2780, HeLa, MCF-7, SK-BR-3, HT-29, HCT-116 p53+/+, HCT-116 p53-/- ve HL-60 gibi aynı anda çok fazla hücre hatlarında yapılan bir in vitro çalışmada liken metabolitlerinde parietin, atranorin, usnic asit ve gyrophoric asitin proliferatif ve sitotoksik etkinliği incelenmiş ve hücre proliferasyonu hücre döngüsünün kontrolü ve apoptozis, çekirdek morfolojisi üzerinde doza ve zamana bağlı olarak etki gösterdiği belirtilmiştir (40). Özellikle kanser alanında liken sekonder metabolitleri ile yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinde programlı hücre ölümünün ve hücre döngüsünün engellenmesi, VEGF sinyali üzerinden anjiyogenezin baskılanması, telomeraz aktivitesini inhibe ederek hücre ölümsüzlüğünün durdurulması üzerine yapılmaktadır. İmmünojenetik araştırmalar ise invazyon metataz gibi hücre basamaklara etkisi, genom stabilitesi, büyüme faktörlerinin hedeflenerek hücre gelişiminin durdurulması gibi birçok hücre ve moleküler biyolojik mekanizmalara etkisinin aydınlatılması üzerine yapılmaktadır (41). Likenler ve bitkiler, geçmişten günümüze, içermiş olduğu güçlü antioksidan ve biyaktif bileşiklerle fitokimyasal ve farmakolojik açıdan dikkatleri üzerine çeken bir hedef olarak araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarla ilgi uyandırmış çeşitli hastalıkların tedavisinde ve

özellikle günümüzde kanser araştırmalarında oldukça önemli bir potansiyel olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda özellikle bitkisel, fungal veya liken ilişkili bileşiklerle yapılan çalışmalarda ve tedaviye yönelik temel araştırmalarda ümit vaat eden sonuçlar ortaya çıkması bu konuda yapılacak daha detaylı çalışmaları destekleyecek ve onlar için temel ön bilgi oluşturacaktır. Özellikle kanser ile ilişkili çalışmalarda sinyal iletim yolağı gibi önemli moleküler düzeyde mekanistik çalışmalarla ve genişletilmiş in vitro ve in vivo araştırmalarla likene dayalı bileşiklerin kullanılarak klinik denemelere geçilmesi ve tedavide önemli çözümlere potansiyel oluşturması açısından liken biyoaktif bileşenlerinin önemi daha da artacaktır.

Sonuç olarak, parietinin hepatoselüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde ilk defa sitotoksik ve genotoksik etkinliği araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Tüm bu veriler parietinin tekli ve kombine olarak çeşitli ajanlarla birlikte etkinliği yüksek bir biyoaktif bileşik olabileceği ve yapılacak olan daha detaylı çalışmalarla etki mekanizmalarının da aydınlatılarak bu alana katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kutluk T., Kars A., 2001. Kanser konusunda güncel Bilgiler. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü Kanser ve Savaş Daire Başkanlığı, Ankara.
2. WHO, 2017. Guide to cancer early diagnosis. World Health Organization Document Production Services, Geneva, Switzerland.
3. IARC, 2014. Bernard WS, Chistoper PW. World Cancer Report, IARC Press, Lyon.
4. Merlo LM., Pepper JW., Reid BJ., Maley CC., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nat Rev Cancer, 6, 924-935.
5. Guyton AC., Hall JE., 2017. Protein sentezi, hücre fonksiyonu ve hücre çoğalmasının genetik kontrolü. In "Tıbbi Fizyoloji", Ed., BÇ Yeğen, 13th ed., 27-43, Güneş Tıp Kitapevi Ltd şti, Ankara.
6. Hanahan D., Weinberg RA., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 144, 646-674.
7. Lodish H., Berk A., Kaiser CA., Krieger M., Scott MP., Bretscher A., Ploeg H., Matsudaira P., 2008. Molecular Cell Biology. 6th Ed., 1107-1108, WH Freeman and Company, New York.
8. Türker FA., Kayaalp SO., 2002. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. In "Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji", Ed., SO Kayaalp, 380-415, Feryal Matbaacılık, Ankara.
9. Tozkoparan B., Aytaç SP., 2007. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon S-transferazlar. Hacettepe Üniv Ecz Fak Derg, 27, 139-164.
10. Jemal A., Bray F., Center MM., Ferlay J., Ward E., Forman D., 2011. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 61, 69-90.
11. Athar M., Back JH., Tang X., Kim KH., Kopelovich L., Bickers DR., Kim AL., 2007. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. Toxicol Appl Pharmacol, 224, 274-283.
12. Venugopal R., Liu RH., 2012. Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. Food Sci Human Welln, 1, 1-13.
13. Singh CK., George J., Ahmad N., 2013. Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management. Ann NY Acad Sci, 1290, 113-121.
14. Kojiro M., Roskams T., 2005. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. Seminars in Liver Dis, 25, 133-142.
15. Roy-byrne PP., Bystritsky A., Russo J., Craske MG., Sherbourne CD., Stein MB., 2005. Use of herbal medicine in primary care patients with mood and anxiety disorders. Psychosomatics, 46, 117-122.
16. Steinmetz KA., Potter JD., 1991. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. Cancer Causes Cont, 2, 427-442.
17. Ziegler RG., Colavito EA., Hartge P., McAdams MJ., Schoenberg JB., Mason TJ., Fraumeni JF., 1996. Importance of alpha-carotene, beta-carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung

- cancer. *Natl Cancer Inst*, 9, 612-615.
18. Villanueva A., Newell P., Chiang DY., Friedman SL., Llovet JM., 2007. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Dis*, 27, 55-76.
 19. Shibata S., Ukita T., Tamura T., Miura Y., 1948. Relation between chemical constitutions and antibacterial Effects of usnic acid and derivatives. *Jap Med J*, 1, 152-155.
 20. Özenoğlu S., Aydoğdu G., Dinçsoy AB., Taghidizaj AA., Derici K., Yılmaz E., Aras S., Cansaran-Duman D., 2013. Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 70, 215-226.
 21. Asahina Y., 1967. Lichenologische Notizen. *J Jap Bot*, 42, 289-294.
 22. Huneck S., Yoshimura I., 1996. Identification of Lichen Substances. e-Book. 1th Edition. 304-349, Springer-Verlag, Hiedelberg, Berlin.
 23. Miao V., Legal MFC., Brown D., Sinnemann S., Donaldson G., Davies J., 2001. Genetic Approaches to Harvesting Lichen Products. *Trends in Biotech*, 19, 349-355.
 24. Şekerli M., Kılıç N., Cansaran-Duman D., 2017. Liken metabolitlerinin antikanser aktivite etkisinin moleküler düzeydeki mekanizmaları. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 74, 95-102.
 25. Comini L., Vieyra FEM., Mignone RA., Paez PL., Mugas ML., Konigheim BS., Cabrera JL., Montoya SCN., Borsarelli CD., 2017. Parietin: an efficient photo-screening pigment in vivo with good photosensitizing and photodynamic antibacterial effects in vitro. *Photochem Photobiol Sci*, 16, 201-210.
 26. Solhaug K., Gauslaa Y., 1996. Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *xanthoria parietina*. *Oecologia*, 108, 412-418.
 27. Gauslaa Y., Ustvedt EM., 2003. Is parietin a UV-B or a blue-light screening pigment in the lichen *xanthoria parietina*?. *Photochem Photobiol Sci*, 2, 424-432.
 28. Backorova M., Jendzelovsky R., Kello M., 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol in Vitro*, 26, 462-468.
 29. Basile A., Rigano D., Loppi S., Di Santi A., Nebbioso A., Sorbo S., Conte B., Paoli L., De Ruberto F., Molinari AM., Altucci L., Bontempo P., 2015. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *Int J Mol Sci*, 16, 7861-7875.
 30. Edwards HGM., Newton EM., Wynn-Williams DD., Coombes SR., 2003. Molecular spectroscopic studies of lichen substances 1: parietin and emodin. *J Mol Struct*, 648, 49-59.
 31. Gibellini L., Pinti M., Nasi M., Montagna JP., Biasi SD., Roat E., Bertocelli L., Cooper EL., Cossarizza A., 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med*, 1-15.
 32. Viskupicova J., Ondrejovic M., Sturdik E., 2008. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *J Food Nutr Res*, 47, 151-162.
 33. Mitrovic T., Stamenkovic S., Cvetkovic V., Tosic S., Stankovic M., Radojevic I., Stefanovic O., Comic L., Dacic D., Curcic M., Markovic S., 2011. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int J Mol Sci*, 12, 5428-5448.
 34. Brisdelli F., Perilli M., Sellitri D., 2013. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytother Res*, 27, 431-437.
 35. 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.
 36. Russo A., Caggia S., Piovano M., 2012. Effect of Vicanicin and on human prostate cancer cells: role of Hsp70 protein. *Chem Biol Interact*, 195, 1-10.
 37. Galanty A., Koczurkiewicz P., Wnuk D., Paw M., Karnas E., Podolak I., Wegrzyn M., Borusiewicz M., Madeja Z., Czyz J., Michalik M., 2017. Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and

- melanoma cancer cells. *Toxicol in Vitro*, 40, 161-169.
38. Basile A., Rigano D., Loppi S., Di Santi A., Nebbioso A., Sorbo S., Conte B., Paoli L., De Ruberto F., Molinari AM., Altucci L., Bontempo P., 2015. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *Int J Mol Sci*, 16, 7861-7875.
 39. Triggiani D., Ceccarelli D., Tiezzi A., Pisani T., Munzi S., Gaggi C., Loppi S., 2009. Antiproliferative activity of lichen extracts on murine myeloma cells. *Biologia*, 64, 59-62.
 40. Backorova M., Backor M., Mikes J., Jendzelovsky R., Fedorocko P., 2011. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol in Vitro*, 25, 37-44.
 41. Kim H., Keun KK., Hur JS., 2015. Anticancer activity of lichen metabolites and their mechanisms at the molecular level. In "Recent Advances in Lichenology", Ed., DK Upreti. 201-208, Springer, India.