MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MDA-MB-231 ÜZERİNE *CLADONİA FURCATA*'NIN KORUYUCU ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Elif AKBULUT
Yüksek Lisans Öğrencisi, Yozgat Bozok Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı,
ORCID:0000-0001-7425-6015
Mustafa KOCAKAYA
Doç. Dr., Boğazlayan Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim,Organik Tarım Pr.,
ORCID:0000-0003-2306-8094

ÖZET

Likenler, mantar ve alg birlikteliğinden meydana gelen bitkilerdir. *Cladonia furcata*, esas olarak Cladonia cinsinin bir üyesidir ve çok çeşitli habitatlarda yaşarlar. Canlı organizmaların temel olarak gündelik yaşamında ihtiyaç duyduğu çoğu element likenlerde bol miktarda bulunur. Yapılan araştırmalarda Cladonia da dahil olmak üzere birçok liken türünün en bol bileşeni olan usnik asitin antibakteriyel, antimitotik ve antiviral etkileri ortaya konulmuştur. Bundan dolayı memeli hücre kültürleri olan MDA-MB-231 üzerindeki *C. furcata* dozlarının koruyucu etkileri araştırmak amaçlanmıştır. Bu çalışmada, meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerine artan dozlarda *C. furcata* uygulanarak etkileri, MTT yöntemi (3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid) ve apoptoz yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. *C. furcata*'nın MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki koruyucu etkisi kontrol grubu ve uygulama grupları (15-250 µg) oluşturularak LD50 değeri 62,5 µg olarak bulunmuştur. Yapılan sitotoksisite analizi sonuçlarına göre, *C. furcata* konsantrasyonun artışına bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerdeki apoptoz ve nekroz tespiti için kontrol grubu, 15.6 µg/ml, 31.25 µg/ml, 62.5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml *C. furcata* uygulanan gruplar floresan mikroskopta incelenerek nekroza uğrayan hücrelerin fotoğrafları ile kanserli hücreler üzerine öldürücü etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmaların ışığında *C. furcata*'nın insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde in vitro koşullarda sitotoksik etki gösterdiği dozlar, çalışılan parametreler kapsamında tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Meme Kanseri, *Cladonia furcata*, Apoptoz Testi, MTT Testi.

PROTECTIVE EFFECTS OF *Cladonia furcata* ON MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINE

ABSTRACT

Lichens are communities made up of fungi and algae. Cladonia furcata is primarily a member of the genus Cladonia and they live in a wide variety. Most elements found in living organisms are mainly found in lichens. The antibacterial, antimitotic and antiviral effects of usnic acid, which is the most abundant structure of many analogies, including Cladonia, have been demonstrated.. Therefore, it was aimed to investigate the protective effects of *C. furcata* doses on mammalian cell cultures, MDA-MB-231. In this study, the effects of *C. furcata* applied to breast cancer cell line MDA-MB-231 cells at increasing doses were evaluated using the MTT method (3-(4,5-dimethyl triazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) and apoptosis method. investigated. The protective effect of *C. furcata* on MDA-MB-231 cells was found to be 62.5 µg by forming the control group and

administration groups (15-250 µg). According to the results of cytotoxicity analysis, it was determined that cell viability decreased due to the increase in *C. furcata* concentration. For the detection of apoptosis and necrosis in cells, the control group, 15.6 µg/ml, 31.25 µg/ml, 62.5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml *C. furcata* applied groups were viewed under a fluorescent microscope and the photos of the cells that underwent apoptosis and necrosis were taken. It has been determined that it has a lethal effect on cells. In the light of these studies, the doses at which *C. furcata* exerted a cytotoxic effect on the human breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro were determined within the scope of the studied parameters.

KEYWORDS: Breast Cancer, *Cladonia furcata*, Apoptosis Test, MTT Test.

1.GİRİŞ

Antimutajenik ve antikarsinojenik özelliğe sahip kimyasal bileşikleri araştırmak, insanlarda kanser ve mutasyon oranlarındaki artış nedeniyle günümüzde zorunlu hale gelmiştir. Kanseri de içine alan çeşitli hastalıkların gelişmesine karşı likenin ikincil metabolitlerinin koruyucu olabileceğini gösteren in vivo ve in vitro deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen kanıtlar; kimyasal olarak koruyucu etkiye sahip bitki metabolitleri üzerine antimutajenik ve antigenotoksik çalışmaların büyük ölçüde artmasını da sağlamıştır (Samarghandian, Boskabady ve Davoodi, 2010).

Likenler, alg ve mantarlardan meydana gelen kompozit organizmalardır ve birçok ekosistemde yer alan önemli bir bileşendir. Sıcak ve soğuk bölgelerde, kayaların üzerinde birçok bölgede yetişirler. Likenler ayrıca yüzlerce yıldır birçok ülkede insan hastalıklarına çare olarak kullanılmaktadır. Likenler, depsidler, depsidonlar, dibenzofuranlar, ksantonlar ve terpen türevlerini içeren sekonder metabolitler üretirler. Bu metabolitler bazen talusun kuru kütlesinin %30'undan fazlasını oluşturur. Likenler ve metabolitleri çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahiptir: antiviral, antibiyotik, antitümör, alerjenik, bitki büyümesini inhibe edici, antiherbivor, ekolojik roller ve enzim inhibitörü olarak görev yapmaktadırlar (Ali, Nihal, Zuhal ve Ali, 2009).

Apoptozis biyolojik görevlerini tamamlamış yapısal elemanları ya da DNA'sı hasar görmüş hücrelerin, ilişkili olduğu doku ve hücrelere zarar vermeyecek bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan, genlerle kontrol altında tutulan ve gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölümüdür. Embriyonik dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca deri, gastrointestinal ve immum sistem gibi pek çok sisteme ait dokuların devamlılığı mitoz, hücre ölümü ve apoptozis arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Organizmada, yaşam boyunca değişen derecelerde dejenerasyon ve nekroz şekillenir. Apoptoz ve nekrozun belirlenmesinde morfolojik görüntüleme, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve immunolojik yöntemler kullanılmaktadır. Apoptoz, floresan mikroskobu ile de tespit edilmektedir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabilme özelliği gösterdiğinden hücrenin kromatini görünür hale gelir. Böylelikle de çekirdeği görünür hale gelmesi sağlanmış olur. Akridin portakalı ve Hoechst, apoptotik hücrelerde yoğunlaştırılmış DNA'yı göstermek için kullanılan iki florokromdur. Akridin turuncu boyamasındaki DNA normal hücrelerde sarı yeşil iken apoptotik DNA parlak

yeşil boyanır ve çok yoğundur (Columbano, 1995). Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, ölü hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanınır (Nguyen, Ndoye, Hall, Zia, Arredondo, Chernyavsky ve Grando, 2001; McCarthy ve Evan, 1997).

Kültürlenmiş hücreler üzerindeki anti-proliferatif özelliklerinin yüksek verimli taranması için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Deneylerde kullanılan tetrazolyum tuzları mitokondriyal metabolizma hızını ölçer ve dolaylı olarak canlı hücre sayılarını yansıtır (Thangapazham, Singh, Sharma, Warren, Gaddipati ve Maheshwari, 2007; Li ve Song, 2007). MTT, metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan dehidrojenazlar ve indirgeyici ajanlar tarafından indirgeme üzerine suda çözünmeyen mor-mavi bir formazan veren sarımsı sulu bir çözelti verir (Meerloo, Kaspers ve Cloos, 2011; Stockert, Blázquez, Cañete, Horobin ve Villanueva, 2012). Suda çözünür tetrazolyum tuzlarının ilgili formazanlarına biyolojik olarak indirgenmesi genellikle hücre "redoks aktivitesinin" bir göstergesi olarak kabul edilir. Reaksiyon esas olarak mitokondriyal enzimlere ve elektron taşıyıcılarına atfedilir. Bununla birlikte, MTT indirgemesi, bir dizi başka mitokondriyal olmayan enzim tarafından da katalize edilebilir (Bernas ve Dobrucki, 2002).

2. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

2.1. Deneysel Çalışmalar

Liken Örneklerinin Hazırlanışı

Cladonia furcata (Hudson) Schrad, 26.04.2022 tarihinde Hatay, Arsuz şehrinden toplanmıştır. Örnekler, Boğazlıyan Meslek Yüksekokulu Liken Laboratuvarında muhafaza edilmektedir. İncelenen likenlerin tespiti standart yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Likenin Ekstrakte Edilmesi

Liken örneğinden 10 g tartılır ve havanda toz haline gelinceye kadar öğütülür. Toz haline gelen likenler % 70'lik metanol kullanılarak Kocakaya ve arkadadaşlarının yöntemine göre ekstre edildi (Z.Kocakaya, M.Kocakaya ve Karatoprak, 2021). Özler süzülür ve daha sonra bir döner buharlaştırıcıda azaltılmış basınç altında konsantre edilir. Kuru ekstreler, testlerde kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilir. Ekstraktlar deneyler için steril ortamda %70'lik alkolde çözüldü ve seyreltmeler besi yeri kullanarak gerçekleştirilir. Plaka yüzeyinde temiz bir görüntü elde etmek ve partiküllerden temizlemek amacıyla hazırlanan liken dozları 0,22'lik filtre ile süzülür.

Hücre Kültürünün Hazırlanışı

Bu çalışmada, *C.furcata*'nın meme kanseri hücreleri üzerindeki koruyucu etkileri araştırılırken, hücre hattı olarak MDA-MB-231 hücre hattı seçildi. MDA-MB-231 hücre hattı RPMI besi yerinde 37 °C'de %95 hava ve %5 CO_2 içeren nemli bir atmosferde büyütülür. Hücrelerinin temini, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) elde edildi. Hücre kültürü çalışmalarımız Yozgat Bozok Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarında yapıldı.

MTT Testi

96'lık well plate kullanılarak 3'lü tekrarlar halinde hücreler eşit bir şekide her bir kuyucuğa 10^4 sayıda hücre gelecek şekilde dağıtılır ve 24 saat boyunca hücrelerin bulunduğu yüzeye yapışması için inkübasyona bırakılır. Oda sıcaklığına getirilen homojen bendiokarb dozları eşit miktarlarda kuyucuklara dağıtılır ve üzeri besiyeri ile tamamlanarak dozların etki etmesi için 24 saat inkübasyona bırakılır. Sarı renkli MTT solüsyonu 10'ar ul kontrol dahil tüm kuyucuklara ilave edilir, 4 saatin ardından PBS buffer eklenir ve spektrofotometrede 570 nm absorbasta ölçümleri alınır. LC_{50} dozu 62,5 µg/mL olarak tespit edildi.

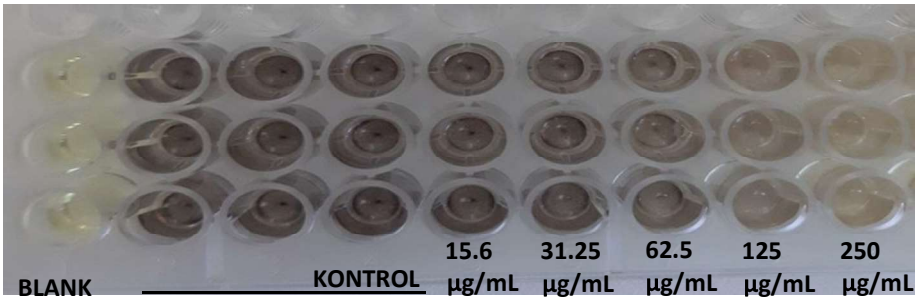
Apoptoz Testi

Apoptoz testi için 96'lık well plate kullanılır. Her bir kuyucuk için hücre 10^5 olacak şekilde ekildi ve 24 saat hücrelerin yapışması için inkübasyona bırakılır. İnsan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'e *C. furcata* dozları 15.6, 31.15, 62.5, 125, 250 µg/ml ve kontrol olmak üzere 6'lı grup oluşturulur. Hücreler tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak ependroflara alınır. Hücreler, 1:1 oranda ependrofta pipet edilerek akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EtBr) ile hazırlanmış olan boya ile 1:1 oranda pipet edilir ve lamlara yayarak lamel ile kapatılıp floresan mikroskopta analiz edilir ve görüntüleri çekilir.

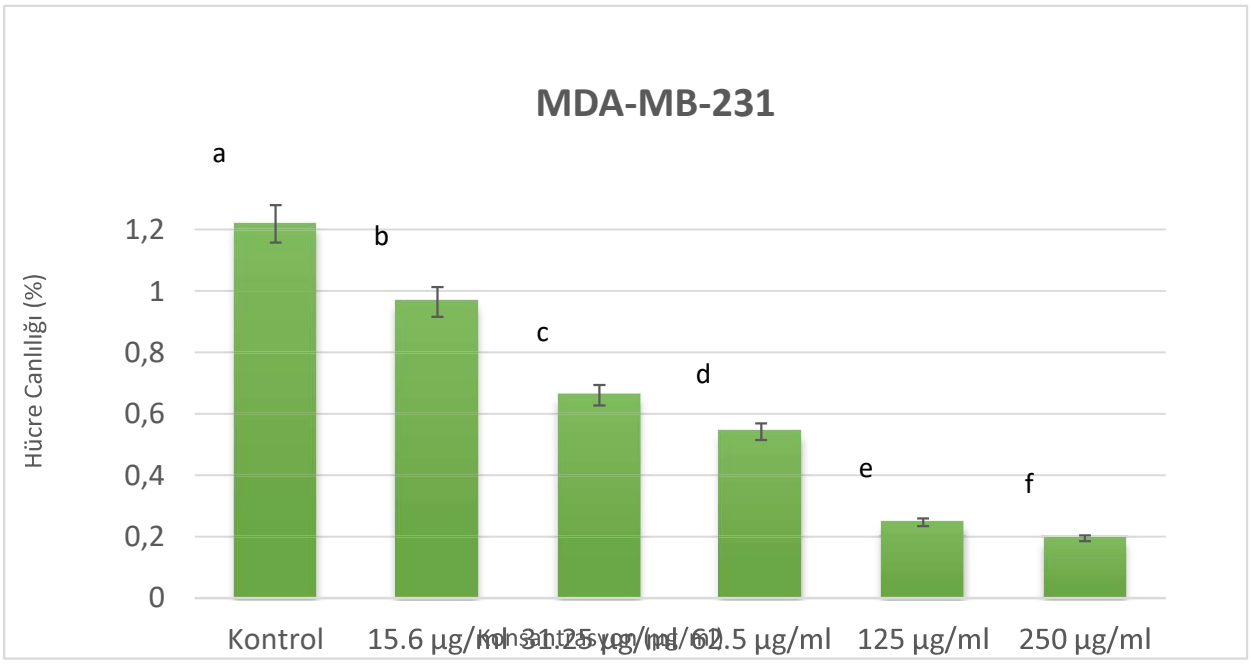
2.2. Deneysel Sonuçlar

MTT Testi Sonuçları

Kontrol grubu %100 canlı olarak kabul edilerek elde edilen sonuçlar neticesinde artan dozlarda uygulanan *C. furcata*'nın MDA-MB-231 hücrelerinde, hücre canlılığının azalttığı belirlenmiştir. Hücrelerin %50 'sinin öldüğü değer olan LC_{50} değeri 62.5 µM olarak belirlendi. Elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları alınarak bunlardan blank değerleri çıkarılıp normalizasyon gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 2.1 ve 2.2 de gösterilmiştir.



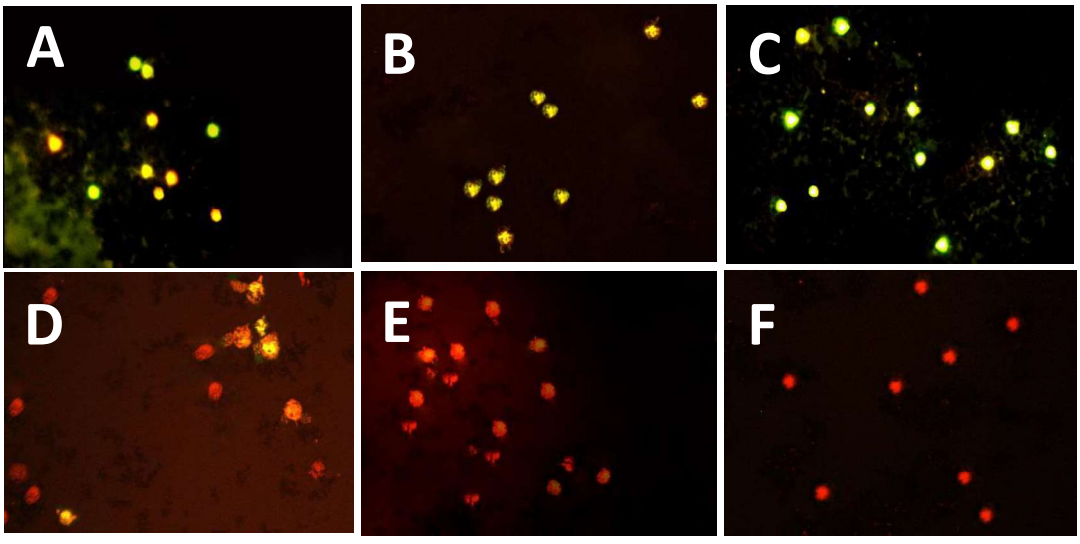
Şekil 2.1. Mor renkli formazan kristallerinin 96'lık well platteki görüntüsü.



Şekil 2.2. *C. furcata*'nın MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

Apoptoz Testi Sonuçları

Apoptoz nekroz bakımından MDA-MB-231 hücreleri üzerine uygulanan *C. furcata* likeninin artan dozlarda uygulama grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hücre ölümünün doza bağlı olarak artışı tespit edilmiştir. Artan dozlarda *C. furcata* likeni uygulama grupları ile kontrol kıyaslandığında LC_{50} değerinin 62.5 µg/ml'lik dozda olduğu, hücrelerin tamamının öldüğü LC_{100} dozun ise 125 µg/ml'lik dozda olduğu MTT testi sonuçlarıyla birlikte doğrulanmıştır. Sonuçlar Şekil 2.3'de görsel olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Apoptotik hücrelerin floresan mikroskobunda görüntüsü. Kontrol grubu (A), 15.6 µg/mL *C. furcata* uygulanan grup (B), 31.25 µg/mL *C. furcata* uygulanan grup (C), 62.5 µg/mL *C. furcata* uygulanan grup (D), 125 µg/mL *C. furcata* uygulanan grup (E), 250 µg/mL *C. furcata* uygulanan grup (F).

3. SONUÇ

Meme kanserinin tedavisindeki önemli ilerlemelere rağmen, bu hastalık kanser ölümlerinden ikinci sırada yer almaktadır. Yapılan araştırmalarda 250'den fazla vaka incelenmiş olup diyetsel fitokimyasalların, liflerin tüketimi arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir (Borek, 2004). Araştırmalar sonucunda *C. furcata* likeninin K562 hücre proliferasyonunu üzerinde inhibe edici etkileri apoptoz, MTT testi ile kanıtlanmıştır (Lin, Cai, Li, Liu, Yin ve Zhao, 2001).

Bu araştırmada insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'e *C. furcata* uygulanmış ve MTT canlılık testi ile kanserli hücreler üzerinde oluşturmuş olduğu sitotoksisite ile etkisi tespit edildi. *C. furcata*'nın 15.6 ve 31.25 µg/ml'lik uygulama gruplarında hücre canlılığının azaldığı gözlemlendi ve böylece hücrelerin %50 'sinin öldüğü değer olan LC_{50} değeri 62.5 µg/ml olarak tespit edildi. Hücrelerin tamamını öldüren LC_{100} değeri ise 125 µg/ml olarak tespit edildi. Artan doza bağlı olarak uygulanan *C. furcata* MDA-MB-231 hücrelerinin proliferatif etkisini durdurduğu apoptoz testi ile doğrulandı. MTT testinde belirlenen hücrelerin yarısını öldüren 62.5 µg/mL'lik doz apoptoz testi sonuçları ile uyumludur. Bu çalışma Yozgat Bozok Üniveritesi Proje Koordinasyon Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından FYL-2022-1042 kodu ile desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *47*(4), 236-242.

Borek, C. (2004). Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative cancer therapies*, 3(4), 333-341.

Columbano, A. (1995). Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *Journal of cellular biochemistry*, *58*(2), 181-190.

Horobin, R., & Kiernan, J. (Eds.). (2020). *Conn's biological stains: a handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine*. Taylor & Francis.

Kocakaya, Z., Kocakaya, M., & şeker karatoprak, g. ö. k. ç. e. (2021). Comparative analyses of antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of different Cladonia species and determination of fumarprotocetraric acid amounts. *ksu tarım ve doga dergısı-ksu journal of agrıculture and nature*, *24*(6).

Li, J., & Song, L. (2007). Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for Microcystis aeruginosa (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia*, *46*(5), 593-599.

McCarthy, N. J., & Evan, G. I. (1997). 15 Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Current topics in developmental biology*, *36*, 259-278.

Meerloo, J. V., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture* (pp. 237-245). Humana Press.

Nguyen, V. T., Ndoye, A., Hall, L. L., Zia, S., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., ... & Grando, S. A. (2001). Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *Journal of cell science*, *114*(6), 1189-1204.

Samarghandian, S., Boskabady, M. H., & Davoodi, S. (2010). Use of in vitro assays to assess the potential antiproliferative and cytotoxic effects of saffron (Crocus sativus L.) in human lung cancer cell line. *Pharmacognosy Magazine*, *6*(24), 309.

Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, *114*(8), 785-796.

Thangapazham, R. L., Singh, A. K., Sharma, A., Warren, J., Gaddipati, J. P., & Maheshwari, R. K. (2007). Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer letters*, *245*(1-2), 232-241.

Lin, X., Cai, Y. J., Li, Z. X., Liu, Z. L., Yin, S. F., & Zhao, J. C. (2001). *Cladonia furcata* polysaccharide induced apoptosis in human leukemia K562 cells. Acta Pharmacologica Sinica, 22(8), 716-720.