

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Usnik Asit SH-SY5Y Nöroblastom Hücrelerinde Tümör Baskılayıcı Genleri Aktive Ederek Apoptozu Tetikler ve İnvazyonu Azaltır

Ceren OY, Sema SERTER KOÇOĞLU

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye.

ÖZET

Usnik asit, *Usnea diffracta* Vain'den kaynaklanan bir dibenzofuran bileşiğidir ve anti-inflamatuar, antifungal ve antikanser etkileri vardır. Ancak, antitümör etkilerinin moleküler mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. Bu çalışma, usnik asidin nöroblastom hücrelerinde antikanser aktivitesinin altında yatan apoptoz ve otofaji aracılı mekanizmaları belirlemeyi amaçlamaktadır. Usnik asidin SH-SY5Y nöroblastom hücre canlılığı üzerine etkileri CCK-8 testi, hücre migrasyonu üzerine etkileri yara iyileşme deneyi, invazyon, apoptoz, otofaji ve tümör baskılayıcı genler üzerine etkileri ise Western blot ile değerlendirilmiştir. Usnik asidin SH-SY5Y nöroblastom hücre canlılığını doz ve zaman bağımlı olarak azalttığı gösterilmiş ve IC₅₀ dozu 24 saatte 10 µM olarak belirlenmiştir. Usnik asidin nöroblastom hücre migrasyonu ve invazyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Kontrol grubu yara alanı 0. saatte ortalama 628,9 ± 35,59 cm² iken 24 saatte 234,8 ± 30,98 cm² olarak belirlenmiştir. Usnik asit yara alanı ise 0. saatte ortalama 895,2 ± 30,07 cm² iken 24 saatte 801,9 ± 15,23 cm²'dir. Usnik asidin nöroblastom hücre apoptozunu indüklediği belirlenmiştir. Usnik asit kesilmiş kaspaz-3 ekspresyonunda 4 katlık bir artışa neden olmuş, otofaji markörlerinde ise bir değişiklik oluşturmamıştır. Usnik asit uygulaması SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Sonuç olarak, usnik asidin nöroblastom hücrelerinde tümör baskılayıcı genleri aktive ederek apoptozu tetikleyebileceği, böylelikle invazyon, migrasyon ve hücre canlılığında azalışa neden olabileceği gösterilmiştir. Usnik asidin nöroblastom hücrelerinde antikanser aktivitesinin altında yatan mekanizmaların daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Usnik asit. Nöroblastom. Apoptoz. Otofaji. İnvazyon.

Usnic Acid Triggers Apoptosis and Reduces Invasion by Activating Tumor Suppressor Genes in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells.

ABSTRACT

Usnic acid is a dibenzofuran compound derived from *Usnea diffracta* Vain and has anti-inflammatory, antifungal and anticancer activities. However, the molecular mechanism of its antitumor effects has not been fully elucidated. This study aims to identify the apoptosis and autophagy-mediated mechanisms underlying the anticancer activity of usnic acid in neuroblastoma cells. The effects of usnic acid on SH-SY5Y neuroblastoma cell viability were evaluated by CCK-8 test, its effects on cell migration by wound healing assay, and its effects on invasion, apoptosis, autophagy and tumor suppressor genes by Western blot. Usnic acid was shown to reduce SH-SY5Y neuroblastoma cell viability in a dose and time dependent manner, and the IC₅₀ dose was determined as 10 µM at 24 hours. Usnic acid has been shown to significantly reduce neuroblastoma cell migration and invasion. The control group wound area was determined to be 628.9 ± 35.59 cm² on average at hour 0, while it was determined to be 234.8 ± 30.98 cm² at 24 hours. Usnic acid wound area was 895.2 ± 30.07 cm² at 0 hour and 801.9 ± 15.23 cm² at 24 hours. It has been determined that usnic acid induces neuroblastoma cell apoptosis. Usnic acid caused a 4-fold increase in the expression of cleaved caspase-3, but did not cause any change in autophagy markers. Usnic acid application caused an increase in the expression of tumor suppressor genes in SH-SY5Y neuroblastoma cells. As a result, it has been shown that usnic acid can trigger apoptosis by activating tumor suppressor genes in neuroblastoma cells, thereby causing a decrease in invasion, migration and cell viability. The mechanisms underlying the anticancer activity of usnic acid in neuroblastoma cells need to be supported by further studies.

Keywords: Usnic acid. Neuroblastoma. Apoptosis. Autophagy. Invasion.

Geliş Tarihi: 18.Kasım.2024

Kabul Tarihi: 17.Aralık.2024

Dr. Sema SERTER KOÇOĞLU,
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Bursa, Türkiye.
Tel: 0537 665 93 19
E-posta: semaserterkocoglu@uludag.edu.tr

Yazarların ORCID Bilgileri:

Ceren OY: 0000-0002-2828-1196

Sema SERTER KOÇOĞLU: 0000-0002-3180-4007

Nöroblastomlar, nöral krest hücrelerinden kaynaklanan ve sempatik sinir sistemi ile ilişkili kötü huylu solid tümörlerdir. Sıklıkla böbrek üstü bezi ve omurganın her iki tarafında sinir ağlarında yerleşik *trunkus sempatikus* isimli alanlarında lokalizedirler. Nöroblastomlar, bebeklerde en çok rastlanan solid tümörlerdir. Çocuk ve gençlerde ise, beyin tümörlerinden sonra en çok rastlanan ekstrakranial solid tümörlerdir. Nöroblastomlar, çocuk ve gençlerde görülen tüm kanserlerin %7'sini ve çocukluk çağı

kanser ölümlerinin %15'ini oluşturur¹⁻⁴. Hastaların yaklaşık %90'ı 5 yaşın altındadır ve özellikle embriyolojik dönemde ortaya çıkan bir tümör olduğu için hastaların çoğunluğunu yeni doğan ve bebekler oluşturur. Nöroblastomlar, 1 yaşından büyük çocuklarda kontrolsüz ve hızlı büyüyerek lenf sistemi aracılığıyla kemik iliği, kemikler, karaciğer ve deri üzerinde metastaz yaparlar^{5,6}.

Pediyatrik nöroblastom tedavisinde hastanın fizyolojik durumu, tümörün yapısı, lokalizasyonu ve evresine bağlı olarak kemoterapi, radyoterapi, immün terapi ve gen tedavisi gibi yöntemler uygulanmaktadır^{5,7}. Kemoterapi, malign tümör tedavisi için kullanılan ve metastazı azaltan en çok kullanılan ve en güçlü tedavi yaklaşımlarından biridir. Fakat tedavi sürecinde kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelere de zarar verir ve güçlü yan etkilere sahiptir. Moleküler çalışmalarda ilerlemeler ile tümör hücrelerinin metastazını, bölünmesini ve gelişimini kontrol eden mekanizmalardan bazılarının yavaş yavaş aydınlatılıyor oluşu, araştırmacıları kanser tedavisinde daha az toksik olan doku ve organlara zarar vermeyen ve maliyeti daha az olan yeni terapötik ajanların keşfine yönlendirmiştir.

Doğal ürünler, biyoaktif ajanların paha biçilmez kaynaklarıdır ve kanser de dahil olmak üzere farklı insan hastalıklarını tedavi etmek için ilaçların keşfinde öncüdür. Bunun nedeni, yüksek biyofonksiyonellik ve moleküler çeşitliliğin yanı sıra sentetik bileşiklerle karşılaştırıldığında üstün etkinlik ve güvenlidir. 1946-2019 döneminde antitümör ilaç olarak onaylanan küçük moleküllerin toplam sayısı 259'dur ve bunların %79'u doğal kökenlidir⁸. Bunlara doğal bileşikler, bunların türevleri (genellikle yarı sentetik olarak modifiye edilmiş) veya doğal ürünlerden esinlenen bileşikler (toplam sentezle yapılır, ancak farmakofor doğal bir üründen gelir) dahildir⁸. Usnik asit (2,6-diasetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetildibenzo[b,d]furan-1,3(2H,9bH)-dion, UA) likenlerde bulunan en çok araştırılan doğada (-) ve (+) izomerler olarak bulunan biyoaktif bileşiklerden biridir⁹. Usnik asit, antibakteriyel, antiviral, antimikotik, antiprotozoal, antiinflamatuvar, analjezik, nöroprotektif ve antikanser gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir^{8,10}. Ancak, usnik asidin nöroblastom hücrelerinde antitümör etkilerinin moleküler mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. Bu nedenle, mevcut çalışma usnik asidin nöroblastom hücrelerinde antikanser aktivitesinin altında yatan apoptoz ve otofaji aracılı mekanizmaları belirlemeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü ve reaktifler

Bu çalışmada, SH-SY5Y nöroblastom hücre dizisi (ATCC, USA) kullanıldı. Hücreler 2 mM L-glutamin, penisilin (20 units/mL), streptomisin (20µg/mL) ve

%10 fetal sıgır serumu içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kültür ortamında %95 hava ve %5 CO₂ basıncı altında 37 °C'de inkübe edildi. (+)-Usnik asit kloroform içinde çözüldü. SH-SY5Y hücreleri 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM (+)-usnik asit ile 24 ve 48 saatler için doz ve zaman-bağımlı olarak inkübe edildi.

Hücre sayımı

Hücre sayımları Neubauer lamı kullanılarak tripan mavisi boyama yöntemi ile yapıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 10 µl alınarak Neubauer hücre sayım lamına aktarıldı ve invert mikroskopta 10X büyütmede sayım işlemi gerçekleştirildi. 4 büyük kare içerisinde bulunan şeffaf hücreler sayılarak ortalaması alındı. Aşağıda belirtilen formül kullanılarak 1 ml'de bulunan toplam hücre sayısı hesaplandı.

Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml) = (Toplam Hücre sayısı / 4) x 10.000 x Dilüsyon Faktörü

Hücre canlılığı

Usnik asidin nöroblastom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Abbkine, Çin) kiti kullanıldı. CCK8 kiti ticari olarak elde edildi ve deneyler ilgili firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirildi. Deney aşamasında, SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa 100 µL'lik bir hacimde 1 x 10⁴ yoğunlukta ve 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Hücreler plakaların tabanına yapıştıktan sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyucuklara tam besiyeri eklenerek kontrol grubu, usnik asit ile doz grupları oluşturuldu. 24 ve 48 saat olmak üzere hücreler inkübasyona bırakıldı. Her bir inkübasyon süresi sonunda karanlık ortamda kuyucuklar içerisindeki sıvı kısım uzaklaştırılmadan her bir kuyucuğa 10 µl CCK8 çözümü eklendi. Plakalar, 4 saat inkübasyona bırakıldı ve mikropilaka okuyucuda 450 nm'de okutuldu. Elde edilen sonuçlar ile yüzde ölüm ve IC₅₀ değeri hesaplandı¹¹.

% Hücre Canlılığı = Doz grubu optik dansite değeri/Kontrol optik dansite değeri X 100

Yara iyileşmesi

Kontrol ve doz grupları (Usnik asit-IC₅₀) için 60x15 mm kültür plakalarında, her plakada 1x10⁶ SH-SY5Y hücresi olacak şekilde ekim yapıldı ve 37°C'de %5 CO₂ ortamda inkübasyona bırakıldı. Kontrol ve doz grupları tam yoğunluğa ulaştığında, 100-200 µl'lik mikropipet ucu kullanılarak çizgi çizildi. Ardından kontrol grubuna sadece DMEM/F-12 besiyeri, doz grubuna ise usnik asit (IC₅₀ dozu) ilavesi yapılarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. 0 ve 24 saatlerde görüntüler alındı, kontrol ve doz grupları arasındaki yara alanları Image J software programı ile hesaplandı. Yara iyileşmesi değerlendirmesi 3 tekrar şeklinde yapıldı¹².

Nöroblastomda Usnik Asit Etkileri

Western blot

SH-SY5Y hücreleri 75 cm²'lik flasklara ekildi. 24 saat sonra kontrol ve doz grupları oluşturuldu ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Protein izolasyonu buz içinde ripa lizis buffer (proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren) kullanılarak yapıldı. Proteinlerin konsantrasyonları BCA kit (ABP Biosciences, ABD) kullanılarak ölçüldü. Proteinler %12 SDS/PAGE (20µg) kullanılarak ayrıştırıldı ve PVDF membrana (EMD Millipore) transfer edildi. PVDF membran %5'lik yağsız süt tozu ile bloklandı ve primer antikorlar ile bir gece +4 °C'de inkübe edildiler. 24 saat inkübasyon sonrası anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated sekonder antikorlar (1:20000; BTLab) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Proteinler, WesternBright ECL HRP substrate kit (Advansta, ABD) ile bulundu ve dijital tarayıcı (C-Digit Blot Scanner; Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA) kullanılarak görüntüledi. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları: PTEN (1:1000, cat no: #9559, CST), P53 (1:500, cat no:#2527, CST), MMP-19 (1:1000, cat no:142-44-1-AP, Proteintech), Cleaved caspase 3 (1:500, cat no:#AF7022, Affbio), Cleaved caspase 9 (1:1000, cat no:#20750, CST), Beklin 1 (1:1000 cat no:#3738, CST), ATG 5 (1:1000, cat no:#12994, CST) olacak şekilde kullanıldı¹³.

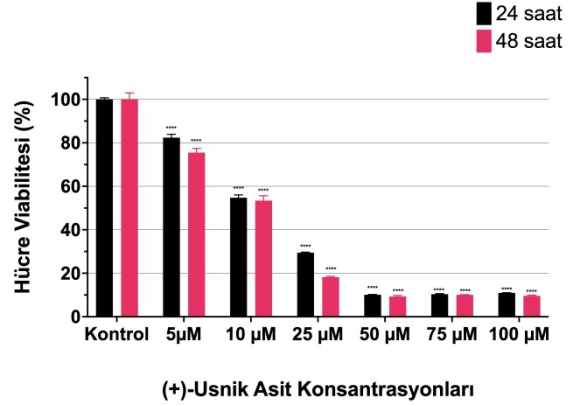
İstatistiksel analiz

Veri analizi GraphPad Prism 9 istatistik programı ile gerçekleştirildi. Normal dağılım gösteren iki veri setinin istatistiksel karşılaştırması Student t-test analizi ile çoklu veri seti karşılaştırmaları ise tek yönlü ANOVA, Dunnet post-hoc karşılaştırma testleri ile değerlendirildi ve p < 0,05 anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama±SEM şeklinde verilmiştir.

Bulgular

Usnik asidin nöroblastom hücre canlılığı üzerine etkileri

Usnik asit SH-SY5Y nöroblastom hücre canlılığını doz ve zaman bağımlı olarak azaltmıştır. 24 saatte 5 µM usnik asit nöroblastoma hücre canlılığını %82'ye (P<0,0001) 10 µM %54'e (P<0,0001), 25 µM %29'a (P<0,0001), 50 µM %10'a (P<0,0001) düşürmüştür (Şekil 1). 48 saatte 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM usnik asit SH-SY5Y hücre canlılığını sırasıyla, %75'e (P<0,0001), %53'e (P<0,0001), %18'e (P<0,0001) ve %9'a (P<0,0001) düşürmüştür. Usnik asidin SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde IC50 dozu 24 saatte 10 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 1).



(+)-Usnik Asit Konsantrasyonları

Şekil 1.

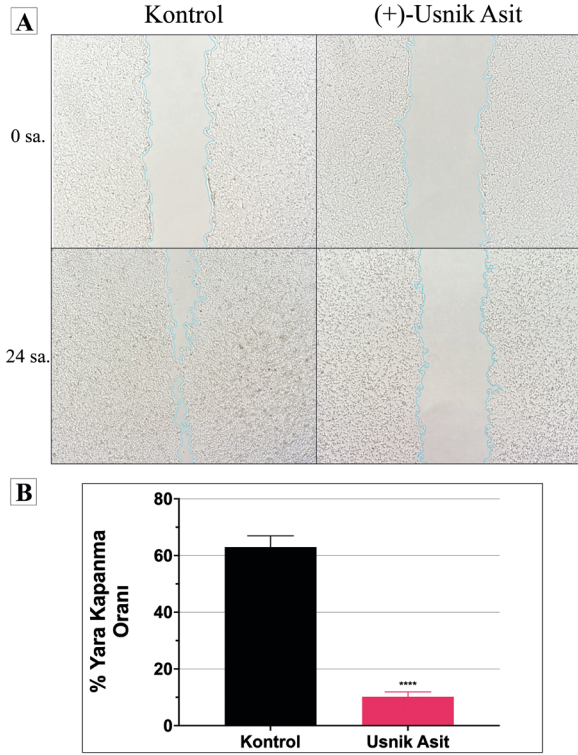
(+)-Usnik asidin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkisi. İstatistiki anlamlılık One Way Anova sonrasında Dunnet analizi ile yapılmıştır. ***p<0,0001 kontrol grubuna kıyasla istatistiksel farkları gösterir.

Usnik asidin nöroblastom hücre migrasyonu ve invazyonu üzerine etkileri

Usnik asidin nöroblastom hücre migrasyonu ve invazyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Şekil 2, 3). Usnik asidin nöroblastom hücre migrasyonuna etkileri yara alanı ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu yara alanı 0. saatte ortalama 628,9 ± 35,59 cm² iken 24 saatte 234,8 ± 30,98 cm² olarak belirlenmiştir. Usnik asit yara alanı ise 0. saatte ortalama 895,2 ± 30,07 cm² iken 24 saatte 801,9 ± 15,23 cm²'dir (Şekil 2B). SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubunda % yara kapanması 62,99 ± 3,978 cm² olarak belirlenirken usnik asit grubu % yara kapanması 10,18 ± 1,713 cm² (P<0,0001) olarak belirlenmiştir (Şekil 2B). Usnik asidin SH-SY5Y hücre invazyonu üzerine etkileri MMP-19 invazyon belirteci ile değerlendirilmiştir (Şekil 3A). Usnik asit grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MMP-19 ekspresyonunda 0,5 katlık bir azalış belirlenmiştir (Şekil 3B).

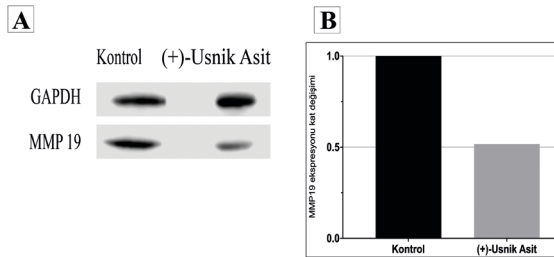
Usnik asidin nöroblastom hücre apoptozu ve otofaji üzerine etkileri

Usnik asidin nöroblastom hücre apoptozunu indüklediği belirlenmiştir. Usnik asidin nöroblastom hücre apoptozuna etkileri kesilmiş kaspaz-3 ve kesilmiş kaspaz-9 ekspresyonu ile otofaji üzerine etkileri ATG5 ve beclin-1 protein ekspresyonu ile değerlendirilmiştir (Şekil 4A, B, C, D). Usnik asit kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kesilmiş kaspaz-3 ekspresyonunda 4 katlık bir artışa neden olmuş, kesilmiş kaspaz 9 ekspresyonunda ise bir değişiklik oluşturmamıştır (Şekil 4B, C). Usnik asit otofaji markırları üzerinde değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 4D, E).



Şekil 2.

SH-SY5Y hücrelerinde Kontrol grubu ve (+)-Usnik asit uygulanan grupta 0, 24 saatlerde yara alanları görüntüsü (A). Her iki grupta zamana bağlı % yara kapanması (B). İstatistiki anlamlılık Bağımsız Örneklem T testi ile yapılmıştır. **** $p < 0,0001$ kontrol grubuna kıyasla istatistiksel farkı gösterir.



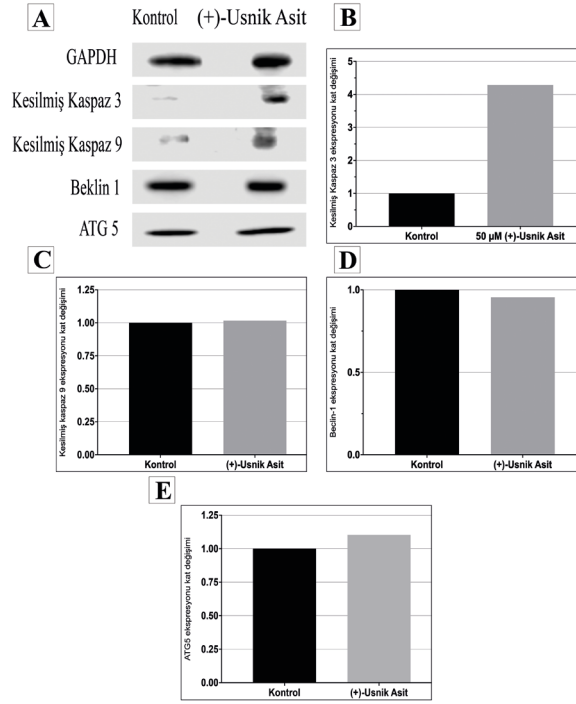
Şekil 3.

SH-SY5Y hücrelerinde (+)-Usnik asidin MMP-19 ekspresyonu üzerine etkisinin Western Blot ile gösterilmesi (A,B).

Usnik asidin nöroblastom hücrelerinde p53 ve PTEN ekspresyonları üzerine etkisi

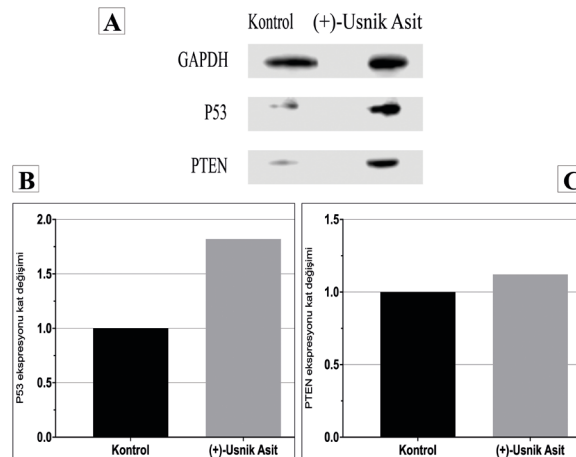
Usnik asit uygulaması SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunda artışa neden olmuştur (Şekil 5). Usnik asidin nöroblastom hücrelerinde hücre döngüsü giriş yolları, invazyon, proliferasyon ve hücre sağ kalımı süreçlerinde rol alan PTEN ve p53 tümör baskılayıcı proteinlerinin ekspresyonu üzerine etkileri western blot analizi ile araştırılmıştır. Protein ekspresyon

seviyeleri protein bantları dansiteleri GAPDH protein bandı dansitesi ile oranlanarak kat değeri şeklinde değerlendirilmiştir (Şekil 5A). Nöroblastom hücrelerinde usnik asit uygulaması kontrol grubuna göre p53 ve PTEN ekspresyonlarında artışa neden olmuştur (Şekil 5B, C).



Şekil 4.

SH-SY5Y hücrelerinde (+)-Usnik asidin apoptoz ve otofaji yolağında rol alan proteinler üzerine etkilerinin Western Blot ile gösterilmesi (A). (+)-Usnik asidin kesilmiş kaspaz 3, kesilmiş kaspaz 9 (B,C) ve beclin 1, ATG 5 (D,E) ekspresyonları üzerine etkileri.



Şekil 5.

SH-SY5Y hücrelerinde (+)-Usnik asidin tümör baskılayıcı p53 v PTEN üzerine etkilerinin Western Blot ile gösterilmesi (A). (+)-Usnik asidin p53 (B) ve PTEN (C) ekspresyonları üzerine etkileri.

Tartışma ve Sonuç

Usnik asit, mantarlar ve yeşil algler ve/veya siyanobakterilerden oluşan simbiyotik bir konsorsiyum olan likenlerden biyolojik olarak aktif bir sekonder metabolittir. Usnik asit, apoptotik hücre ölümü ve hücre döngüsü durması dahil olmak üzere potansiyel kanser önleyici özellikleri açısından incelenmiştir¹⁴. Usnik asidin SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde antikanserojenik özelliklerinin altında yatan mekanizmaya yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bizim çalışmamızda usnik asidin SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde apoptozu tetiklediği, tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu arttırdığı ve invazyonu azalttığı ilk kez gösterilmiştir.

Apoptozis, enerjiye bağımlı moleküler mekanizmaları içeren oldukça karmaşık bir süreçtir. Apoptozis 2 ana yolu içerir: dışsal (ölüm reseptörü yolu) ve içsel (mitokondriyal) yol. Ek olarak, bu 2 yolun birbirine bağlı olduğunu ve birbirini etkilediğini gösteren çalışmalar vardır¹⁵. Kaspaz proteaz ailesi üyeleri apoptozu başlatmada ve sürdürmede önemli roller oynar¹⁶. Kaspazlar genellikle başlatıcılar (kaspaz-2, -8, -9, -10), yürütücüler (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5) olarak sınıflandırılır^{15,16}. Apoptozu açan içsel veya mitokondriyal yol, viral enfeksiyonlar, hipoksi, hipertermi, oksidatif stres ve örneğin kemoterapi veya radyoterapi gören kanser hastalarında olduğu gibi toksik kimyasal veya radyasyona maruziyetten kaynaklanan içsel olarak algılanan stres sinyalleri dahil olmak üzere çeşitli uyarılarla başlatılabilir¹⁷. Bu tür pro-apoptotik hücre stresörlerinin bir sonucu, mitokondriyal dış zarın geçirgenleşmesi ve sitokrom c gibi apoptojenik faktörlerin mitokondriyal intermembran boşluktan sitozole salınmasıdır. Daha sonra, kaspaz-3/7 dahil olmak üzere efektör kaspazların aktivasyonunu tetikleyen bir apoptozomal kompleks (sitokrom c/Apaf-1/kaspaz-9 içeren) oluşur. Benzer şekilde, birçok hücre tipinin canlılığının bağlı olduğu belirli dış büyüme faktörlerine, sitokinlere, hormonlara veya hücre-hücre etkileşimlerine maruziyetinin azaltılması da apoptozisin içsel yolunu aktive edebilir ve böylece bu dış faktörlerin normalde apoptotik yanıt mekanizmasının varsayılan aktivasyonunu engellemede oynadığı hayati rolü ortaya çıkarabilir¹⁷. Geng ve ark, mide kanser hücrelerinde usnik asidin apoptoz ve otofajiyi indüklediğini göstermişlerdir¹⁸. Özben ve ark, meme kanseri hücrelerinde usnik asidin apoptoz ile ilişkili genleri indüklediğini belirlemişlerdir¹⁹. Bu çalışmada usnik asidin SH-SY5Y hücre apoptozu üzerine etkileri western blot ile değerlendirilmiştir. Usnik asidin SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde kesilmiş kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Usnik asit nöroblastom hücrelerinde mitokondriyal

yolağı kullanarak apoptozu indükleyebileceği belirlenmiştir.

Otofaji, çift zarlı otofagozomlar tarafından lizozomlara iletilen hasarlı veya işlevsiz hücre içi bileşenlerin parçalanmasında rol oynayan evrimsel olarak korunan bir stres tepkisi ve parçalayıcı mekanizmadır. Otofajinin karsinogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir²⁰. Bu çalışmada otofaji markırları ATG5 ve beclin-1 western blot ile değerlendirilmiş ve usnik asit uygulaması SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde otofaji markırları üzerinde kontrol grubuyla kıyaslandığında bir değişikliğe yol açmamıştır. Bizim çalışmamız usnik asidin nöroblastom hücrelerinde otofaji yolağından ziyade apoptoz yolağını aktif hale getirerek antikanserojen etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Usnik asidin SH-SY5Y nöroblastom hücre canlılığı üzerine etkileri CCK-8 ile değerlendirilmiş ve usnik asidin nöroblastom hücrelerinde IC50 dozu 24 saatte 10 µM olarak belirlenmiştir. Gimla ve ark, usnik asidin pankreas kanseri hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttığını ve normal hücrelere anlamlı bir toksik etki yaratmadığını göstermişlerdir²¹. Diğer bir çalışmada usnik asidin insan prostat ve melanoma kanserleri üzerinde seçici sitotoksik etkiler yaptığı gösterilmiştir²². Bizim çalışmamız usnik asidin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini destekler niteliktedir.

Göç ve invazyon, canlı hücrelerin önemli bir özelliğidir ve embriyolojik gelişim, kanser metastazı, inflamasyon gibi birçok süreçte kritik bir rol oynar²³. Çalışmamızda hücre göçünü göstermek için yara iyileşmesi deneyi invazyon için ise MMP-19 invazyon belirteci kullanılmıştır. Yara iyileşmesi deneyinde 24 saatte usnik asidin SH-SY5Y hücre migrasyonunu ve invazyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda usnik asidin nöroblastom hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir. İnsan kanserinde en sık tespit edilen anormalliklerden biri p53 tümör baskılayıcı geninin mutasyonudur. p53'ün işlevine özgü olarak apoptotik hücre ölümünü başlatma ve hücre döngüsü durmasına neden olma yeteneği vardır. Dahası, p53 iyonlaştırıcı radyasyon ve kanser kemoterapötik ilaçları gibi DNA'ya zarar veren etkenlere karşı hücre yanıtı kontrol etmede önemli bir rol oynar. p53 işlevinin kaybı radyasyona ve kemoterapötik etkenlere karşı direncin artmasına neden olur ve p53 mutasyon durumunun kanserde klinik sonuçların önemli bir belirleyicisi olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. p53 hem apoptozis hem de hücre döngüsü durmasının önemli bir aracıdır ve DNA hasarı kaynaklı transkripsiyonun düzenlenmesinde ek bir role sahip olabilir. p53'ün hem tümör baskılanmasında hem de DNA hasarı yanıtında önemi, ikisinin yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir²⁴. Bu çalışmada usnik asit

nöroblastom hücrelerinde tümör baskılayıcı p53'ü aktif hale getirerek apoptozu tetiklemiş, invazyon ve migrasyonu baskılayarak antikanserijen etki göstermiş olabilir.

Sonuç olarak usnik asidin SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde apoptozu tetiklediği, otofajiyi değiştirmedeği, tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu arttırdığı ve invazyonu azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada usnik asidin nöroblastom hücrelerinde antikanserijen etkileri ve altında yatan mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır. Usnik asidin nöroblastom hücrelerinde tümör baskılayıcı genleri aktive ederek apoptozu tetikleyebileceği, böylelikle invazyon, migrasyon ve hücre canlılığında azalışa neden olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca usnik asidin nöroblastom hücrelerinde hücre ölüm yolağı olarak otofajiden ziyade apoptozu kullandığı belirlenmiştir. Usnik asidin nöroblastom hücrelerinde antikanser aktivitesinin altında yatan mekanizmaların daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Etik Kurul Onay Bilgisi: Bu çalışma etik onam alınması gereken çalışmalar kapsamı dışında olan hücre kültürü çalışmasıdır.

Araştırmacı Katkı Beyanı: Fikir ve tasarım: S.S.K., C.O.; Veri toplama ve işleme: C.O.; Analiz ve verilerin yorumlanması: S.S.K., C.O.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: S.S.K.”

Destek ve Teşekkür Beyanı:
Bu çalışmada finansal destek kullanılmamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı:
Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(3):203-216. doi:10.1038/nrc1014
2. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;362(23):2202-2211. doi:10.1056/NEJMra0804577
3. Radic-Sarikas B, Halasz M, Huber KVM, vd. Lapatinit potensiyatı cytotoxicity of YM155 in neuroblastoma via inhibition of the ABCB1 efflux transporter. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-8. doi:10.1038/s41598-017-03129-6
4. Vella S, Penna I, Longo L, vd. Perhexiline maleate enhances antitumor efficacy of cisplatin in neuroblastoma by inducing over-expression of NDM29 ncRNA. *Sci Rep*. 2015;5(November):1-13. doi:10.1038/srep18144
5. Alexander F. Neuroblastoma. *Urol Clin North Am*. 2000;27(3):383-392, vii. doi:10.1016/s0094-0143(05)70087-2
6. DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, vd. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1999;21(3):181-189. doi:10.1097/00043426-199905000-00005
7. Ishola TA, Chung DH. Neuroblastoma. *Surg Oncol*. 2007;16(3):149-156. doi:10.1016/j.suronc.2007.09.005
8. Gimla M, Herman-Antosiewicz A. Multifaceted Properties of Usnic Acid in Disrupting Cancer Hallmarks. *Biomedicines*. 2024;12(10). doi:10.3390/BIOMEDICINES12102199
9. Huneck S, Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. *Identification of Lichen Substances*. Published online 1996:11-123. doi:10.1007/978-3-642-85243-5_2
10. Sun TX, Li MY, Zhang ZH, vd. Usnic acid suppresses cervical cancer cell proliferation by inhibiting PD-L1 expression and enhancing T-lymphocyte tumor-killing activity. *Phytother Res*. 2021;35(7):3916-3935. doi:10.1002/PTR.7103
11. Serter Kocoglu S, Oy C, Secme M, Sunay FB. Investigation of the anticancer mechanism of monensin via apoptosis-related factors in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Clin Transl Sci*. 2023;16(9):1725-1735. doi:10.1111/CTS.13593
12. Kocoglu SS, Seçme M, Sunay FB. Erianin as a Promising Novel Agent in the Treatment of Neuroblastoma: The Anticancer Effects and Underlying Molecular Mechanisms. *Anticancer Agents Med Chem*. 2023;23(10):1204-1210. doi:10.2174/1871520623666230228095429
13. Serter Kocoglu S, Secme M, Oy C, Korkusuz G, Elmas L. Monensin, an Antibiotic Isolated from *Streptomyces Cinnamomensis*, Regulates Human Neuroblastoma Cell Proliferation via the PI3K/AKT Signaling Pathway and Acts Synergistically with Rapamycin. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(3). doi:10.3390/ANTIBIOTICS12030546
14. Kumar K, Mishra JPN, Singh RP. Usnic acid induces apoptosis in human gastric cancer cells through ROS generation and DNA damage and causes up-regulation of DNA-PKcs and γ -H2A.X phosphorylation. *Chem Biol Interact*. 2020;315. doi:10.1016/J.CBI.2019.108898
15. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
16. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(6). doi:10.1016/J.BBAMCR.2020.118688
17. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol*. 2022;221(6):e202201159. doi:10.1083/JCB.202201159
18. Geng X, Zhang X, Zhou B, vd. Usnic Acid Induces Cycle Arrest, Apoptosis, and Autophagy in Gastric Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Med Sci Monit*. 2018;24:556-566. doi:10.12659/MSM.908568
19. Özben R, Cansaran-Duman D. The expression profiles of apoptosis-related genes induced usnic acid in SK-BR-3 breast cancer cell. *Hum Exp Toxicol*. 2020;39(11):1497-1506. doi:10.1177/0960327120930257
20. Liu N, Yang C, Yang L, vd. Matrine induces autophagy in human neuroblastoma cells via blocking the AKT-mTOR pathway. *Med Oncol*. 2022;39(11). doi:10.1007/S12032-022-01762-4
21. Gimla M, Pyrczak-Felczykowska A, Malinowska M, vd. The pyrazole derivative of usnic acid inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Cell Int*. 2023;23(1):1-13. doi:10.1186/S12935-023-03054-X/FIGURES/6
22. Galanty A, Koczurkiewicz P, Wnuk D, vd. Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. *Toxicol In Vitro*. 2017;40:161-169. doi:10.1016/J.TIV.2017.01.008
23. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang L V. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*. 2014;(88). doi:10.3791/51046
24. Lee JM, Bernstein A. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1995;14(2):149-161. doi:10.1007/BF00665797