

The Effect of *Usnea Longissima* Extract on Lung Cancer Cell Line (A549)

Usnea Longissima Ekstresinin Akciğer Kanseri Hücre Kültürüne (A549) Etkisi

Durdu Altuner¹ , Saliha Ekşi² , Halis Süleyman¹ , Emine Akyüz Turumtay³ 

¹Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

²Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye

³Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Rize, Türkiye

Cite this article as: Altuner D, Ekşi S, Süleyman H, Akyüz Turumtay E. The Effect of *Usnea Longissima* Extract on Lung Cancer Cell Line (A549). Arch Basic Clin Res 2021; 3(1): 1-5.

ORCID iDs of the authors: D.A. 0000-0002-5756-3459; S.E. 0000-0002-8818-7855; H.S. 0000-0002-9239-4099; E.A.T. 0000-0002-1504-4810.

ABSTRACT

Objective: Some lichens are known to demonstrate anticancer activity. However, to the best of our knowledge, no information is available about the activity of *Usnea longissima* against human lung cancer A549 cells. This study aimed to investigate the effect of *U. longissima* extract on A549 cell line.

Materials and Methods: The effect of *U. longissima* extract on A549 cell morphology in culture medium was investigated at a concentration of 400 µg/ml and examined using an Olympus inverted microscope (CK x41, 10x), and the cytotoxic activity was tested at concentrations of 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, and 6.75 µg/ml according to the protocol published by Mosmann in 1983.

Results: Dimethyl sulfoxide used as solvent did not have any toxic effects on the A549 cells. However, nearly all A549 cells administered with *U. longissima* extract died. *U. longissima* extract damages the cell surface, resulting in their death.

Conclusion: *U. longissima* extract showed dose-dependent cytotoxic effects on A549 cancer cells in vitro. Therefore, it could be useful in the treatment of lung cancers.

Keywords: *Usnea longissima*, lung cancer, cell line

ÖZ

Amaç: Bazı likenlerin antikanser aktivitesi olduğu bilinmektedir. Ancak, *Usnea longissima* liken türünün insan akciğer kanser hücrelerine (A549) karşı aktivitesine ait bilgilere rastlanmadı. Bu çalışmanın amacı *Usnea longissima*'nın, A549 hücre hattına etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: *Usnea longissima* ekstresinin kültür ortamında A549 hücre morfolojisine etkisi 400 µg/ml konsantrasyonda araştırıldı ve Olympus inverted mikroskobu (CK x 41, 10 x) ile incelendi. *Usnea longissima* ekstresinin sitotoksik aktivitesi 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 ve 6,75 µg/ml konsantrasyonlarda 1983'te Mosmann tarafından yayınlanan protokole göre test edildi.

Bulgular: DMSO A549 hücre hattı üzerinde toksik etki oluşturmamıştır. Ancak, *Usnea longissima* ekstresi uygulanan A549 hücrelerin tamamına yakını ölmüştür. Ayrıca, *Usnea longissima* ekstresinin hücreleri yüzeyden kopararak ölümüne neden olduğu anlaşılmaktadır.

Sonuç: *Usnea longissima* ekstresi, in vitro ortamda A549 kanser hücreleri üzerinde doza bağlı olarak sitotoksik etki oluşturmuştur. Bu nedenle akciğer kanserlerinin tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Usnea longissima*, akciğer kanseri, hücre kültürü

GİRİŞ

Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak ve sağkalımı artırmak için cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri gibi bir çok farklı tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (1, 2). Kansere karşı kullanılan ilaçların istenilen düzeyde tedavi sağlayamamasının nedeni, kanser hücresi üzerinde sitotoksik etki oluşturan dozlarının

sağlıklı hücreler üzerinde de toksik etki oluşturmasıdır (3). Bu da başarılı bir kanser tedavisinin sağlıklı insan hücrelerini etkilemeden, kanserli hücre üzerinde sitotoksik etki oluşturan maddelerle sağlanabileceğini işaret etmektedir. Yakın zamanlarda yapılan araştırmalarda, likenlerin kanser tedavisinde alternatif bir yöntem olarak kullanılabilirliği önerilmektedir (3). Bilindiği gibi, likenler başlı başına birer organizma değildirler. Likenler, mantarlar (ascomycetes, basidiomycetes) ve fotosentetik algler-

den meydana gelen simbiyotik birlikteliklerdir (4, 5). Liken yapısındaki tek bir birey gibi davranan alg ve mantarlar, tek başlarına üretmedikleri maddeleri bu ortak yaşamla üretirler. Likenlerin ürettiği bu sekonder metabolitler pulvik, prolikesterinik, fisodik, lobarik, fumarprotosetrarik, usnik asitler, depsidler ve depsidonlardır (6-8).

Çalışmamızda antikanser aktivitesini araştıracağımız Usnea longissima bir liken türüdür. Likenlerin ürettikleri antranorin, gyrophorik asit, parietin ve usnik asit gibi liken metabolitlerinin A2780 (insan yumurtalık kanseri), HeLa (insan serviks adenokarsinoma), MCF-7, SK-BR-3 (insan meme adenokarsinoma), HCT-116 p53+/+, HCT-116 p53/ HT-29 (insan kolon adenokarsinoma), HL-60 (insan promyelotik leukaemia), Jurkat (insan T-hücre leukaemia) kanser hücre hatlarına karşı etkileri araştırılmıştır (9, 10). Bilindiği gibi, maddelerin antikanser aktivitesi, in vivo ve in vitro deney modellerinde araştırılarak saptanmaktadır (11). In vitro deneyler hücre kültür ortamında yapılmaktadır (12). Literatür, Usnea longissima liken türünün ve etil asetatla elde edilen ekstresinin in vitro insan alveolar bazal epitelyel kanser hücrelerine (A549) karşı aktivitesine ait bilgilere rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamızın amacı, Usnea longissima ekstresinin A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisini in vitro kültür ortamında incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücreler

Kültür ortamında deneyeceğimiz A549 hücreleri, Yeditepe Üniversitesi aracılığıyla American Type Culture Collection (ATCC) den temin edildi.

Liken Materyali

Usnea longissima liken türü 2013-2014 yıllarında Trabzon ve Rize çevresindeki ormanlardan toplandı. Tanımlama işlemleri yapılan materyal, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi herbaryumunda (No:HB 1029) muhafaza edilmektedir.

Kimyasal Maddeler

Hücre kültüründe kullanılan RPMI-1640 Hyclone'dan, DMEM, %10 Fetal bovine serumu (FBS), 100ug/ml streptomycin-100U/ml penicilin, %0.25 trypsin-EDTA Gibco'dan, DMSO (max %1.6), Taxol (5nm/ml) ve MTT Sigma'dan temin edilmiştir. Liken ekstraksiyonu için kullanılan Etil Asetat Sigma'dan sağlanmıştır. Ayrıca Santrifüj (Hettich Universal 320 R), Vorteks (Wisd Wisemax), Ultrasonik Banyo (Bandelin Sonorex), Evaporatör (IKA HB10), Manyetik karıştırıcı (IKA RCT Basic) gibi cihazlar kullanılmıştır.

A549 Hücrelerin Hazırlanması

Bu çalışmada, kullanılacak olan A549 hücreler in-vitro koşullarda, RPMI, %10 Fetal bovine serumu (FBS), 100 µg/

ml streptomycin-100 ve µg/ml -100 U/ml penicilin ve %5 CO₂ destekli 37°C deki inkübatörde T75 flasklara 1x10³/ml olacak şekilde pasajlanarak üretime alınmıştır. Kültürler her gün vasat aspire edilerek yeni besiyeri ile beslenmiştir. Flasklardaki hücre yoğunluğu yaklaşık %70-80'e eriştiğinde, hücreler %0,25 tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek içinde soğuk besiyeri bulunan 50 ml falkon tüplerine transfer edilmiştir. Bunu takiben 600 rpm'de çökertilen hücreler 2 kez soğuk RPMI ile yıkandıktan sonra trypan mavisini ile 1:1 oranında dilüe edilerek boyanmış ve inverted mikroskopta (Olympus inverted mikroskop CK X 41, 10 X) sayılmıştır.

Liken Ekstresinin Hazırlanması

Bunun için 100 gram öğütülmüş liken örneği kahverengi şişeye alınarak üzerine 1000 mL etil asetat döküldü ve 2 saat ultrasonik banyoda ekstraksiyona tabi tutuldu. Süzülerek ekstrakt alındı ve geri kalan kısım bir kez daha 1000mL etil asetat ile aynı şekilde ekstrakte edilerek süzüldü. Ekstraktlar bir araya toplanarak evaporatörde 40°C' de çözücüsü uçuruldu.

Hücre Kültürü Çalışması

Hücreler RPMI-1640 10% Fetal bovine serum (FBS) (Gibco) ve antibiotics (100 µg/ml streptomycin+100U/ml penicilin) kullanılarak T25 flasklarda 37°C de ve %5 CO₂ destekli inkübatörde üretilmiştir. Confluent hücreler %0.25 trypsin-EDTA solüsyonu kullanılarak pasajlanmıştır.

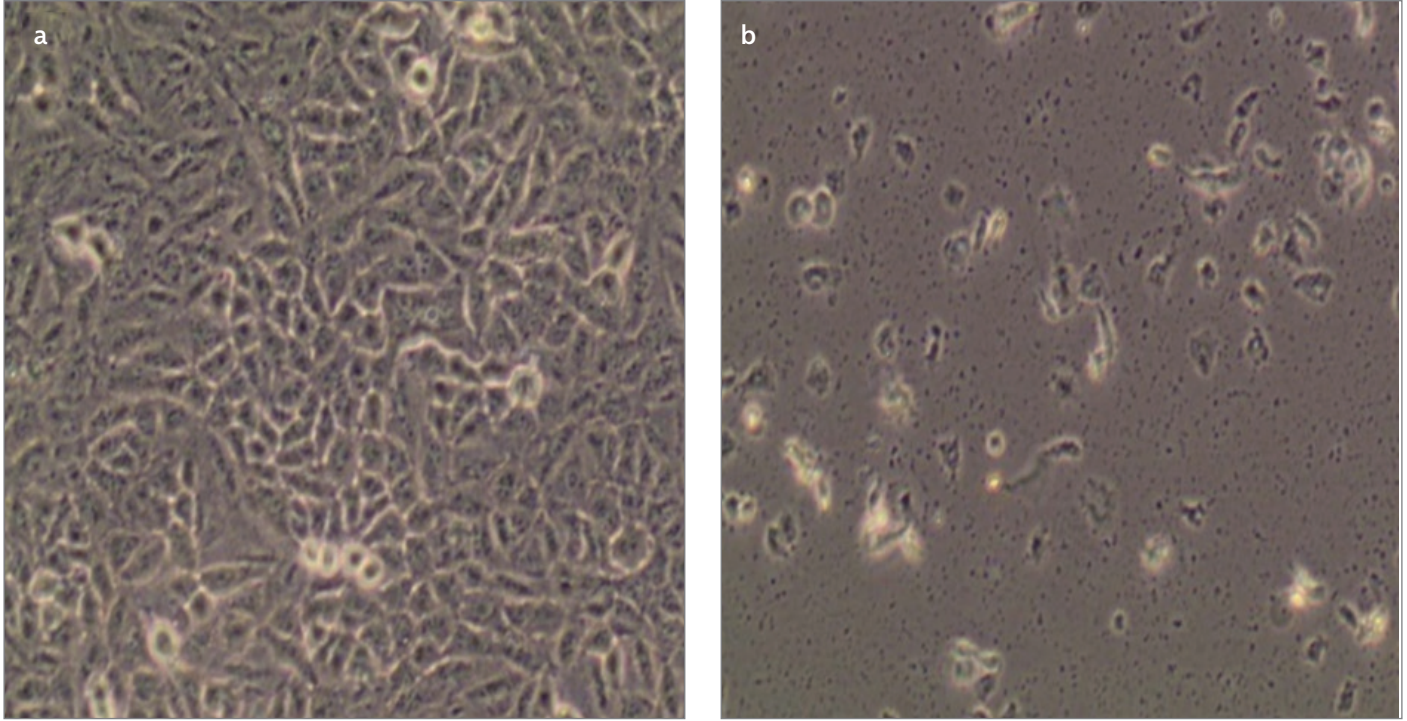
Morfolojik Çalışma

Usnea longissima ekstresinin, stok solüsyonu 100 mg/ml olacak şekilde DMSO'da hazırlandı. A549 hücreleri 1x10⁴ cells/well olacak şekilde 1000µl büyüme mediumu ile birlikte 24-kuyucuklu kültür plakalarına kondu. Ertesi gün, Usnea longissima ekstresi 400 µg/ml konsantrasyonda hücrelere eklendi. DMSO (%0,8) ayrı kuyucuklara eklenerek kültür 37°C de 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra hücrelerde oluşan morfolojik değişiklikler inverted mikroskop (Olympus inverted mikroskop CKX41, 10X) ile incelendi ve sonuçlar fotoğraflandı.

Sitotoksik Çalışma

Sitotoksik aktivite 1983'te Mosmann tarafından yayınlanan protokole göre MTT testi ile saptanmıştır (13). MTT testi kısaca, kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kolorimetrik olarak belirlenmesinde kullanılır. Kültürde, tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli insolubl formazana dönüşür. Formazan DMSO veya izopropanol gibi başka bir çözücüyle solubl hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunur.

A549 hücreleri trypsinize edildikten sonra, 96 kuyucuklu mikropklara 1x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimleri yapıldı. 24 saat sonra DMSO'da hazırlanmış olan Usnea



Resim 1. a, b. Usnea longissima ekstresinin A549 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (a) DMSO ile muamele edilen hücreler (b) Usnea longissima ekstresi ile muamele edilen hücreler

longissima ekstresi 400µg/ml olacak şekilde mikroplakaların ilk kuyucuklarına eklendi; bunu takiben 2X dilüsyonla konsantrasyonlar, 400-200-100-50-25-12.5 ve 6,75 µg/ml olacak şekilde dilüe edildi. DMSO negatif kontrol olarak ayrı kuyucuklara tek başına eklenerek 2X dilüsyonla aynı şekilde dilüe edildi ve kültürler 24 saat 37°C de ve %5 CO₂ koşullarında inkübatörde bekletildi.

İnkübasyon periyodu sonunda, suda 5 mg/ml olarak hazırlanmış olan MTT stoğundan her bir kuyucuğa 10 µl eklenerek kültürler 4 saat daha aynı koşullarda inkübatörde bekletilmiştir. Bu periyod sonunda kuyucuklardaki medium atılarak her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklenerek canlı hücrelerde oluşmuş olan formazan kristalleri çözüldürüldü. Absorbans değerleri ELISA okuyucusunda (Thermo, Multiskan Go) 570 nm dalga boyunda okutuldu ve sitotoksik etki; growth inhibition= [(Kontrol kuyucuğunun absorbansı - Test kuyucuğunun absorbansı) / Kontrol kuyucuğunun absorbansı] X 100 formülü kullanılarak hesaplanmıştır (13). Deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen sonuçlar "ortalama değer ± standart hata" ($\bar{x} \pm SEM$) olarak ifade edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi one-way ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Takibinde post-hoc test olarak Tukey testi yapıldı. Tüm istatistiksel işlemler "IBM SPSS Statistics Version 20" (IBM SPSS Corp.; Armonk, NY, USA) istatistik programında yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Usnea Longissima Ekstresinin A549 Hücre Üzerindeki Morfolojik Etkileri

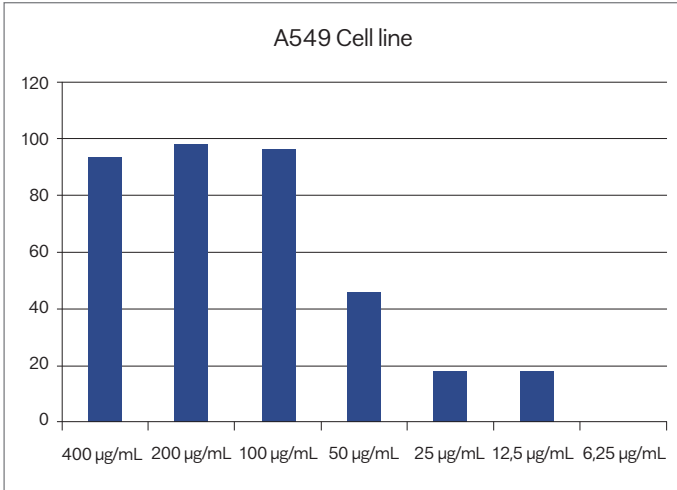
Resim 1a'da görüldüğü gibi, DMSO A549 hücre hattı üzerinde toksik etki oluşturmamıştır. Ancak, Usnea longissima ekstresi uygulanan A549 hücrelerin tamamına yakını ölmüştür. Ayrıca, Usnea longissima ekstresinin hücreleri yüzeyden kopararak ölümüne neden olduğu anlaşılmaktadır (Resim 1b).

Usnea Longissima Ekstresinin A549 Hücre Üzerindeki Sitotoksik Etki Sonuçları

Resim 2'de görüldüğü gibi, in vitro Usnea longissima ekstresi 400 µg/ml, 200µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,75 µg/ml konsantrasyonlarda uygulandığında doza bağlı olarak A549 hücrelerini sırası ile %93, 98, 96, 46, 18 ve 15 oranında öldürmüştür.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, ayrıca Usnea longissima ekstresinin, A549 hücreler üzerinde toksik etkileri kültür ortamında test edildi. Birçok liken türlerinde olduğu gibi, Usnea longissima da usnik asit içermektedir. Usnik asitin antitümör etkileri araştırılmış, ancak diğer metabolitlerinin antikanser aktivitelerine ait veriler oldukça azdır (14, 15). Ayrıca, literatürde bazı liken türlerinin antikanser aktivitesine ait çalışmalara rastlansa da (16, 17), Usnea longissima liken türünün antikanser aktivitesine ait çalışmalar bulunmamaktadır. Parmelia caperata, sulcata ve saxatilis liken



Resim 2. Usnea longissima ekstresinin A549 hücrelere sitotoksik etkisi (% growth inhibisyon)

türlerinden izole edilen usnik asit, protokeratik asit ve salazinik asitlerin FemX (insan melanom ve LSI174 (insan kolon karsinomu) hücre hatlarında in vitro olarak antikanser etkilerine dair bilgiler bulunmaktadır (18). Yine Millot ve arkadaşları (19), Ochrolechia parella liken türünden elde edilen chloro-depsidon, variolarik asit, lekanorik asit, alpha-alektoronik asit, atranorin ve ergosterol peroksidi gibi maddelerin kanser hücrelerine karşı sitotoksik olduğunu belirtmişlerdir.

Bilindiği gibi, antikanser aktivitenin, saptanmasında hücre kültürleri özellikle büyük önem kazanmıştır (20). Bu nedenle, Usnea longissima ekstresinin antikanser aktiviteleri A549 kanser hücre hatlarında in vitro olarak kültür ortamında incelendi. Deney sonuçlarımızdan Usnea longissima ekstresinin kültür ortamında in vitro A549 kanser hücrelerini doza bağlı olarak öldürdüğü anlaşılmaktadır. Literatürlerde usnea longissima liken türünün hücre kültür ortamında antikanser aktivitesine ait çalışmalara rastlanmadı. Ancak, farklı liken türlerinin sınırlı da olsa hücre kültürlerinde antikanser aktivitelerine ait bilgiler bulunmaktadır. Ari F ve arkadaşları Parmelia sulcata Taylor liken türünün insan meme kanser hücre hattında (MCF-7 and MDA-MB-231) etkili bulduklarını rapor etmişlerdir. Hücre kültürü ortamında yapılan bu çalışmada Parmelia sulcata'nın kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyerek sitotoksik etki oluşturduğunu bildirmişlerdir (21). Bir başka çalışmada da *Sphaerophorus globosus*, *Psoroma reticulatum*, *P. pulchrum* ve *P. palladium* liken çeşitlerinden izole edilen sphaerophorin ve pannarin sekonder metabolitlerinin kültür ortamında insan melanoma (M14 hücre hattı) hücrelerine karşı toksik olduğu saptanmıştır; bu sitotoksik etkinin hücre DNA'sının parçalanmasıyla indüklenen apoptozisten ileri geldiği savunulmaktadır (22). Cladonia convoluta, Cladonia rangiformis, Evernia prunastri, Parmelia caperata, Parmelia perlata Platismatia glauca, Ramalina cuspidata ve Usnea rubicunda liken türlerinden elde edilen

ekstrelerin de farklı oranlarda DU-145, meme ve lösemi hücre hatlarında aktiviteleri saptanmıştır (23). Yine Ari ve arkadaşları (24), Parmelia sulcata Taylor ve Usnea filipendula'nın metanol ekstrelerinin insan akciğer (A549) ve karaciğer (Hep3B) kanser hücrelerinin DNA hasarına yol açarak apoptoz benzeri hücre ölümüne neden olduklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, Usnea longissima ekstresi, in vitro ortamda A549 kanser hücreleri üzerinde doza bağlı olarak toksik etki oluşturmuştur.

Ethics Committee Approval: Not applicable.

Informed Consent: Not applicable.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - D.A., S.E., H.S.; Design - D.A., S.E., H.S.; Supervision - D.A., S.E., H.S.; Resources - D.A., S.E., E.A.T.; Materials - S.E., E.A.T.; Data Collection and/or Processing - D.A., S.E.; Analysis and/or Interpretation - D.A., S.E., H.S.; Literature Search - D.A., S.E.; Writing Manuscript - D.A., H.S.; Critical Review - D.A., S.E., H.S., E.A.T.

Conflict of Interest: Authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Uygulanamaz.

Hasta Onamı: Uygulanamaz.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - D.A., S.E., H.S.; Tasarım - D.A., S.E., H.S.; Denetleme - D.A., S.E., H.S.; Kaynaklar - D.A., S.E., E.A.T.; Malzemeler - S.E., E.A.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - D.A., S.E.; Analiz ve/veya Yorum - D.A., S.E., H.S.; Literatür Taraması - D.A., S.E.; Yazıyı Yazan - D.A., H.S.; Eleştirel İnceleme - D.A., S.E., H.S., E.A.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Dellabona P, Moro M, Crosti M, Casorati G, Corti A. Vascular attack and immunotherapy: a 'two hits' approach to improve biological treatment of cancer. Gene Ther 1999; 6: 153-4. [Crossref]
- Torrero MN, Li S. Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment. Gene Ther Mol Biol 2004; 8: 175-80.
- Özenoğlu S, Aydoğdu G, Dinçsoy AB, Taghidizaj AA, Derici K, Yılmaz E, et al. Evaluation of the impact on different types of human cancer cell of lichen secondary compounds. Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology 2013; 70: 215-26. [Crossref]

4. Duman DC. Likenler ve moleküler biyoloji uygulamaları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2008; 65: 43-50.
5. Ingólfssdóttir K. Usnic acid. *Phytochemistry* 2002; 61: 729-36. [\[Crossref\]](#)
6. Elix J, Stocker-Wörgötter E. Biochemistry and secondary metabolites. *Lichen biology* 1996; 1: 154-80.
7. Gudjónsdóttir G, Ingólfssdóttir K. Quantitative determination of protolicheterinic- and fumarprotocetraric acids in *Cetraria islandica* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1997; 757: 303-6. [\[Crossref\]](#)
8. Marcano V, Rodríguez-Alcocer V, Méndez AM. Occurrence of usnic acid in *Usnea laevis* Nylander (lichenized ascomycetes) from the Venezuelan Andes. *J Ethnopharmacol* 1999; 66: 343-6. [\[Crossref\]](#)
9. Miao V, Coëffet-LeGal M-F, Brown D, Sinnemann S, Donaldson G, Davies J. Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends Biotechnol* 2001; 19: 349-55. [\[Crossref\]](#)
10. Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z Naturforsch C J Biosci* 2010; 65: 157-73. [\[Crossref\]](#)
11. Mezenzev R, McDonald JF. Subcutaneous xenografts of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia Jurkat cells in nude mice. *In Vivo* 2011; 25: 603-7.
12. Vančo J, Šindelář Z, Dvořák Z, Trávníček Z. Iron-salophen complexes involving azole-derived ligands: A new group of compounds with high-level and broad-spectrum *in vitro* antitumor activity. *J Inorg Biochem* 2015; 142: 92-100. [\[Crossref\]](#)
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63. [\[Crossref\]](#)
14. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, et al. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 5428-48. [\[Crossref\]](#)
15. Bačkorová M, Bačkor M, Mikeš J, Jendželovský R, Fedoročko P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 37-44. [\[Crossref\]](#)
16. Shrestha G, El-Naggar AM, St. Clair LL, O'Neill KL. Anticancer activities of selected species of North American lichen extracts. *Phytother Res* 2015; 29: 100-7. [\[Crossref\]](#)
17. Xu B, Li C, Sung C. Telomerase inhibitory effects of medicinal mushrooms and lichens, and their anticancer activity. *Int J Med Mushrooms* 2014; 16: 17-28. [\[Crossref\]](#)
18. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* 2012; 19: 1166-72. [\[Crossref\]](#)
19. Millot M, Tomasi S, Articus K, Rouaud I, Bernard A, Boustie J. Metabolites from the lichen *Ochrolechia parella* growing under two different heliotropic conditions. *J Nat Prod* 2007; 70: 316-8. [\[Crossref\]](#)
20. Lacroix M. Persistent use of "false" cell lines. *Int J Cancer* 2008; 122: 1-4. [\[Crossref\]](#)
21. Ari F, Ulukaya E, Oran S, Celikler S, Ozturk S, Ozel MZ. Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes. *Cytotechnology* 2015; 67: 531-43. [\[Crossref\]](#)
22. Russo A, Piovano M, Lombardo L, Garbarino J, Cardile V. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sci* 2008; 83: 468-74. [\[Crossref\]](#)
23. Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 2003; 10: 499-503. [\[Crossref\]](#)
24. Ari F, Aztopal N, Oran S, Bozdemir S, Celikler S, Ozturk S, et al. *Parmelia sulcata* Taylor and *Usnea filipendula* Stirt induce apoptosis-like cell death and DNA damage in cancer cells. *Cell Prolif* 2014; 47: 457-64. [\[Crossref\]](#)