

**RİMKAZOL İLE *P*-KUMARİK ASİT, *O*-KUMARİK ASİT, KURKUMİN  
KOMBİNASYONLARININ CACO-2, A549 VE 3T3 HÜCRELERİNDE SİNERJİSTİK  
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Büşra ÇİFTÇİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmakoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Ağustos 2020**



## ÖZET

### RİMKAZOL İLE *P*-KUMARİK ASİT, *O*-KUMARİK ASİT, KURKUMİN KOMBİNASYONLARININ CACO-2, A549 VE 3T3 HÜCRELERİNDE SİNERJİSTİK SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Büşra ÇİFTÇİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Kanser, günümüzde önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu halini almaktadır. Yapılan araştırmalara göre 2030 yılında dünyada yeni vaka sayısı 27 milyon, kanser hastalığına bağlı ölüm 17 milyon ve toplam kanser hastası sayısının 75 milyon olması beklenmektedir.

Bu tez çalışmasında çeşitli literatür bilgileriyle antikanser etkili selektif sigma-1 reseptör antagonisti olan rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının Caco-2, 3T3 ve A549 hücrelerindeki sinerjistik/additif sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için Caco-2, A549 ve 3T3 hücrelerinde rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin tekli ve kombin uygulamalarının sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile araştırılmış ve her bir hücrede ilaç etkileşim katsayısı (CDI) değerleri hesaplanmıştır.

Rimkazol ve rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin ile kombinasyonlarının 3T3, A549 ve Caco-2 hücrelerindeki sitotoksik etkileri konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmektedir. Hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre; rimkazolün kurkumin ile kombine uygulamalarının A549 hücreleri üzerinde 12.5 µM konsantrasyonda kuvvetli sinerjistik etki (CDI < 0.7), rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombine uygulamalarının 25 µM konsantrasyonda hem 3T3 hem de A549 hücreleri üzerinde kuvvetli sinerjistik etki (CDI < 0.7), rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombine uygulamalarının 12.5 µM konsantrasyonda A549 hücreleri üzerinde kuvvetli sinerjistik etki (CDI < 0.7) gösterdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Rimkazol, Fenolik bileşikler, Sinerjistik etki

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF SYNERGISTIC CYTOTOXIC EFFECTS OF RIMCAZOLE AND *P*-COUMARIC ACID, *O*-COUMARIC ACID, CURCUMIN COMBINATIONS ON CACO-2, A549 AND 3T3 CELLS

Büşra ÇİFTÇİ

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2020

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Today cancer is becoming an increasingly important health and life problem. According to research, it is expected that the number of new cases in the world will be 27 million in 2030, 17 million deaths due to cancer and the total number of cancer patients will be 75 million.

In this thesis, it is aimed to determine the synergistic/additive cytotoxic effects of rimcazole, which is a selective sigma-1 receptor antagonist and considered to be anticancer, and rimcazole's combinations with *p*-coumaric acid, *o*-coumaric acid and curcumin in Caco-2, 3T3 and A549 cells. For this, cytotoxic effects of single and combination applications of rimcazole, *p*-coumaric acid, *o*-coumaric acid and curcumin in Caco-2, 3T3 and A549 cells were investigated by MTT method and coefficient of drug interaction (CDI) values were calculated in each cell.

The cytotoxic effects of rimcazole and, rimcazole with *p*-coumaric acid, *o*-coumaric acid, curcumin in Caco-2, 3T3 and A549 cells occur depending on concentration. According to the CDI calculation results due to cell viability; it has been determined that combined applications rimcazole combined with curcumin have a strong synergistic effect ( $CDI < 0.7$ ) on A549 cells at a concentration of 12.5  $\mu$ M, rimcazole combined with *o*-coumaric acid have a strong synergist effect ( $CDI < 0.7$ ) on both 3T3 and A549 cells at a concentration of 25  $\mu$ M, rimcazole combined with *p*-coumaric acid have a strong synergistic effect ( $CDI < 0.7$ ) on A549 cells at a concentration of 12.5  $\mu$ M.

**Keywords:** Rimcazole, Phenolic compounds, Synergistic effect

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımda, tezimle ilgili her konuda desteğini benden esirgemeyen, tezimin doğru bir şekilde yönlendirilip sonuçlanmasında deneyimleri ve bilgisinden yararlandığım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Lisansüstü eğitimim için beni teşvik edip, fikirleri ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, desteklerini her daim yanımda hissettiğim çok değerli Merkez Müdürlerim Ecz. Aydın TÜRKMEN, Ecz. Elif CİHANOĞLU ve Ecz. Fatih ÇIRAKOĞLU'na; Merkez Müdür Yardımcılarım Ecz. Tuğcan DEMİRTAŞ ve Ecz. Emel BANOĞLU'na,

Yüksek lisans sürecinin tüm aşamalarında çalışmalarımızı birlikte sürdürdüğümüz değerli arkadaşım Ecz. Merve DİLBER'e,

Tez yazım aşamasında manevi desteğini benden esirmeyen, deneyimleri ve hayata bakış açısı ile bana yol gösteren değerli Uzm. Ecz. Aslıhan BEYAN'a,

Yüksek lisans sürecimde anlayış ve manevi destekleriyle hep yanımda olan değerli mesai arkadaşlarım ve eczacı dostlarıma,

Hayatımın her anı ve yüksek lisans öğrenimim süresince maddi ve manevi her konuda bana destek olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Büşra ÇİFTÇİ

Ağustos, 2020

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| BAŞLIK SAYFASI .....                                                           | i            |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....                                                    | ii           |
| ÖZET .....                                                                     | iii          |
| ABSTRACT .....                                                                 | iv           |
| TEŞEKKÜR .....                                                                 | v            |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....                              | vi           |
| İÇİNDEKİLER .....                                                              | vii          |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                          | x            |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                          | xi           |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                           | xiv          |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                         | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                        | 4            |
| 2.1. Kanser .....                                                              | 4            |
| 2.1.1. Kolon kanseri .....                                                     | 7            |
| 2.1.1.1. <i>Caco-2 hücre hattı</i> .....                                       | 9            |
| 2.1.2. Akciğer kanseri .....                                                   | 11           |
| 2.1.2.1. <i>A549 hücre hattı</i> .....                                         | 12           |
| 2.2. Fibroblast Hücreleri .....                                                | 13           |
| 2.2.1. NIH/3T3 hücre hattı .....                                               | 13           |
| 2.3. Rimkazol .....                                                            | 14           |
| 2.4. Fenolik Asitler ( <i>p</i> -Kumarik Asit ve <i>o</i> -Kumarik Asit) ..... | 16           |
| 2.5. Kurkumin .....                                                            | 21           |
| 3. GEREÇLER .....                                                              | 24           |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Araçlar ve Gereçler .....                   | 24           |
| 4. YÖNTEM .....                                                                | 26           |
| 4.1. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması .....                          | 26           |
| 4.1.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu .....                            | 26           |

|                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.2. Rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin konsantrasyonlarının hazırlanması .....                                                                                                                   | 26 |
| 4.2. Hücre Kültürü .....                                                                                                                                                                                                              | 26 |
| 4.2.1. Hücre sayımları .....                                                                                                                                                                                                          | 27 |
| 4.2.2. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi .....                                                                                                                                                                              | 28 |
| 4.2.3. Kombine konsantrasyonların sinerjistik sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi .....                                                                                                                                            | 29 |
| 4.2.3.1. İlaç etkileşim katsayısı (CDI) hesaplama .....                                                                                                                                                                               | 29 |
| 4.2.4. İstatistik .....                                                                                                                                                                                                               | 30 |
| 5. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                                                                                                                                                                                         | 31 |
| 5.1. Rimkazol, <i>p</i> -Kumarik Asit, <i>o</i> -Kumarik Asit ve Kurkuminin Tekli ve Rimkazol ile Kombinasyonlarının 3T3 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi .....                                         | 31 |
| 5.2. Rimkazol, <i>p</i> -Kumarik Asit, <i>o</i> -Kumarik Asit ve Kurkuminin Tekli ve Rimkazol ile Kombinasyonlarının A549 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi .....                                        | 35 |
| 5.3. Rimkazol, <i>p</i> -Kumarik Asit, <i>o</i> -Kumarik Asit ve Kurkuminin Tekli ve Rimkazol ile Kombinasyonlarının Caco-2 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi .....                                      | 39 |
| 5.4. Rimkazolün <i>p</i> -Kumarik Asit, <i>o</i> -Kumarik Asit ve Kurkumin ile Kombinasyonlarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125 $\mu$ M) 3T3, A549 ve Caco-2 Hücreleri Üzerinde Sinerjistik Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi ..... | 43 |
| 5.4.1. Rimkazolün <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombin konsantrasyonlarının 3T3 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri .....                                                        | 43 |
| 5.4.2. Rimkazolün <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombin konsantrasyonlarının A549 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri .....                                                       | 44 |
| 5.4.3. Rimkazolün <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombin konsantrasyonlarının Caco-2 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri .....                                                     | 46 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                                                                                                                                                                            | 52 |

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| <b>KAYNAKÇA .....</b> | <b>53</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>       |           |

## TABLÖLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Tablo 2.1.</b> Caco-2 hücrelerinin özellikleri .....                                                                                                                        | <b>10</b>    |
| <b>Tablo 2.2.</b> Hidroksisinamik asit türevlerinin kimyasal yapısı .....                                                                                                      | <b>17</b>    |
| <b>Tablo 2.3.</b> <i>p</i> -Kumarik asitin antikanser etkileri .....                                                                                                           | <b>18</b>    |
| <b>Tablo 5.1.</b> 3T3 hücrelerinde rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları .....    | <b>43</b>    |
| <b>Tablo 5.2.</b> 3T3 hücrelerinde rimkazol, <i>o</i> -kumarik asit ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları .....    | <b>44</b>    |
| <b>Tablo 5.3.</b> 3T3 hücrelerinde rimkazol, kurkumin ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları .....                  | <b>44</b>    |
| <b>Tablo 5.4.</b> A549 hücrelerinde rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları .....   | <b>45</b>    |
| <b>Tablo 5.5.</b> A549 hücrelerinde rimkazol, <i>o</i> -kumarik asit ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları .....   | <b>45</b>    |
| <b>Tablo 5.6.</b> A549 hücrelerinde rimkazol, kurkumin ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları .....                 | <b>46</b>    |
| <b>Tablo 5.7.</b> Caco-2 hücrelerinde rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları ..... | <b>46</b>    |
| <b>Tablo 5.8.</b> Caco-2 hücrelerinde rimkazol, <i>o</i> -kumarik asit ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları ..... | <b>47</b>    |
| <b>Tablo 5.9.</b> Caco-2 hücrelerinde rimkazol, kurkumin ve kombine uygulamalarının<br>(25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları .....               | <b>47</b>    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                        | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 2.1. Karsinogenezin oluşumu .....                                                                                                                | 4            |
| Şekil 2.2. Dünya Sağlık Örgütünün 2018 yılı verilerine göre tüm kanserlerin her iki cinsiyette ve her yaşta görülen toplam vaka ve ölüm sayıları ..... | 5            |
| Şekil 2.3. 2018'den 2040'a kadar tahmini dünya çapında gelecekteki kanser ve mortalite insidansı .....                                                 | 6            |
| Şekil 2.4. Kolorektal kanserde belirli genlerin mutasyonu .....                                                                                        | 8            |
| Şekil 2.5. Caco-2 hücreleri .....                                                                                                                      | 9            |
| Şekil 2.6. 21 günlük kültür sonrası polarize Caco-2 hücrelerinin SEM (scanning electron microscope) görüntüsü .....                                    | 11           |
| Şekil 2.7. A549 hücreleri .....                                                                                                                        | 12           |
| Şekil 2.8. Fibroblast hücreleri .....                                                                                                                  | 13           |
| Şekil 2.9. Rimkazolün kimyasal yapısı .....                                                                                                            | 15           |
| Şekil 2.10. Kolon kanserinde fenolik asitlerin antikanser mekanizması .....                                                                            | 19           |
| Şekil 2.11. <i>p</i> -Kumarik asitin antikanser etkisinin moleküler mekanizması .....                                                                  | 20           |
| Şekil 2.12. Kurkuminin kimyasal yapısı ve biyolojik kaynakları .....                                                                                   | 21           |
| Şekil 2.13. Kurkumin tarafından modüle edilen hücresel moleküler hedefler .....                                                                        | 22           |
| Şekil 4.1. Hücre kültür kapları .....                                                                                                                  | 26           |
| Şekil 4.2. Cedex smart slide (A) ve Cedex XS otomatik hücre sayıcı (B) .....                                                                           | 28           |
| Şekil 4.3. Canlı hücreler tarafından 96 kuyulu bir plakada MTT'nin formazan tuzuna kimyasal reaksiyonla metabolize olması .....                        | 28           |

|                                                                                                                                                                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Şekil 5.1.</b> 3T3 hücrelerinde 25 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkuminin tekli ve rimkazol ile kombin uygulamalarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....    | <b>31</b> |
| <b>Şekil 5.2.</b> 3T3 hücrelerinde 12.5 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkuminin tekli ve rimkazol ile kombin uygulamalarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....  | <b>32</b> |
| <b>Şekil 5.3.</b> 3T3 hücrelerinde 6.25 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkuminin tekli ve rimkazol ile kombin uygulamalarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....  | <b>33</b> |
| <b>Şekil 5.4.</b> 3T3 hücrelerinde 3.125 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkuminin tekli ve rimkazol ile kombin uygulamalarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları ..... | <b>34</b> |
| <b>Şekil 5.5.</b> A549 hücrelerinde 25 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....                           | <b>35</b> |
| <b>Şekil 5.6.</b> A549 hücrelerinde 12.5 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....                         | <b>36</b> |
| <b>Şekil 5.7.</b> A549 hücrelerinde 6.25 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....                         | <b>37</b> |
| <b>Şekil 5.8.</b> A549 hücrelerinde 3.125 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....                        | <b>38</b> |
| <b>Şekil 5.9.</b> Caco-2 hücrelerinde 25 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....                         | <b>39</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Şekil 5.10.</b> Caco-2 hücrelerinde 12.5 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....  | <b>40</b> |
| <b>Şekil 5.11.</b> Caco-2 hücrelerinde 6.25 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları .....  | <b>41</b> |
| <b>Şekil 5.12.</b> Caco-2 hücrelerinde 3.125 µM konsantrasyonlardaki rimkazol, <i>p</i> -kumarik asit, <i>o</i> -kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları ..... | <b>42</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|            |                                                                                                                                                                                                    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A549       | : İnsan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı                                                                                                                                          |
| ANOVA      | : Analysis of Variance (Varyans Analizi)                                                                                                                                                           |
| APC        | : Adenomatöz Polipozis Koli                                                                                                                                                                        |
| ATCC       | : American Type Culture Collection                                                                                                                                                                 |
| ATF        | : Activating Transcription Factor                                                                                                                                                                  |
| Bax        | : Bcl-2-Associated X Protein                                                                                                                                                                       |
| BCL2       | : B-Cell Lymphoma 2                                                                                                                                                                                |
| Caco-2     | : Cancer coli-2 (İnsan kolorektal kanser hücre hattı)                                                                                                                                              |
| CDI        | : Coefficient of Drug Interaction (İlaç Etkileşim Katsayısı)                                                                                                                                       |
| CHOP       | : DNA Damage-inducible Transcript 3, also known as C/EBP Homologous Protein                                                                                                                        |
| C-Myc      | : Myelocytomatosis Cellular Oncogene                                                                                                                                                               |
| COX-2      | : Cyclooxygenase-2                                                                                                                                                                                 |
| DCS/S MAD4 | : Monoclonal Antibody                                                                                                                                                                              |
| DMEM       | : Dulbecco's Modified Eagle's Medium                                                                                                                                                               |
| DMSO       | : Dimetilsülfoksit                                                                                                                                                                                 |
| DTG        | : 1,3-di-o-toliguanidin                                                                                                                                                                            |
| ECM        | : Extracellular matrix                                                                                                                                                                             |
| FBS        | : Fetal Bovine Serum                                                                                                                                                                               |
| GLOBOCAN   | : Global Cancer Observatory (Dünyanın birçok ülkesinde ulusal düzeyde, başlıca kanser türlerinin insidansı, mortalitesi ve prevalansı hakkında güncel tahminler sunmak amacıyla oluşturulan proje) |
| Grp        | : Glucose Regulated Protein                                                                                                                                                                        |

|                |                                                                                                                                    |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GRP 78         | : 78 kDa Glucose Regulated Protein                                                                                                 |
| IL             | : Interleukin                                                                                                                      |
| IRE1 $\alpha$  | : Inositol-requiring Enzyme 1 $\alpha$                                                                                             |
| iNOS           | : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz                                                                                               |
| JNK            | : The C-Jun N-terminal Kinase                                                                                                      |
| K-RAS          | : Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog                                                                                       |
| LOX            | : Lipxygenase                                                                                                                      |
| MMP-9          | : Matrix Metalloproteinase-9                                                                                                       |
| MTT            | : 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür                                                                        |
| NF- $\kappa$ B | : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells                                                                   |
| NIH/3T3        | : Fare Embriyonik Fibroblast Normal Hücre Hattı                                                                                    |
| NOXA           | : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced <i>protein</i> 1 is a <i>protein</i> that in humans is encoded by the PMAIP1 <i>gene</i> |
| <i>p</i>       | : Significance (Anlamlılık)                                                                                                        |
| PBS            | : Phosphate Buffer Saline                                                                                                          |
| P53            | : Tumor Suppressor Gene                                                                                                            |
| PERK           | : Protein Kinase R-like ER Kinase                                                                                                  |
| PUMA           | : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis                                                                                           |
| ROS            | : Reactive Oxygen Species                                                                                                          |
| SKF 10.047     | : N-alillnormetazosin                                                                                                              |
| STAT           | : Signal Transducer and Activator of Transcription (Transkripsiyon Aktivatörü)                                                     |
| TNF            | : Tümör Nekroz Faktörleri                                                                                                          |
| UPR            | : Unfolded Protein Response                                                                                                        |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde teknolojinin ilerlemesiyle, sağlıkta başarılı adımlar atılmış ve hastalıkların tedavisinde önemli mesafeler kat edilmiştir. Tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte sağlık hizmetlerine verilen önemin artması, kaza ve akut durumlarda hızlı tedavi olanaklarının sunulması erken yaşta ölümlerin azalması, insan ömrünü uzatırken; önceleri nadir görülen hastalıkların daha sık görülmesine neden olmuştur. Ayrıca hızlı kentleşme, sanayileşme beraberinde çeşitli stres etkenlerini getirmiş bununla birlikte kronik hastalık insidansı artmıştır. Kronik hastalıklar içerisinde kanser bugün dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye’de kalp hastalıklarına bağlı ölümlerden sonra ikinci sırayı almıştır (Kavradım ve Özer, 2014).

Son yıllarda tedavi modellemelerindeki önemli gelişmelere rağmen, ne hastalığın insidansı ne de kansere bağlı mortalite son 30 yılda değişmemiştir. Mevcut antikanser ilaçlar ciddi yan etkilerle ilişkili sınırlı etkinlik sergilemesinin yanında ayrıca pahalıdır. Bu nedenle bu dezavantajlara sahip olmayan farmakolojik ajanların tanımlanması gerekmektedir (Shanmugam vd., 2015). Ancak çeşitli yan etkiler mevcut tedavilerden kaynaklanabilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan doğal ürünler ile ilgili artan çalışmalar son 25 yılda yayınlanmıştır. Bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin birçok işlevi ve terapötik etkilerinde, neredeyse hiç toksisite ve yan etki yoktur (Zhang vd., 2019).

Sigma reseptörleri onkoloji alanında ilgi uyandırmasına rağmen, tümör biyolojisindeki rolü hala gizemini korumaktadır. Predominant subsellüler lokalizasyonu ve ana faaliyet alanı endoplazmik retikulumdur (Tesei vd., 2018). Endoplazmik retikulum ve plazma membranında yaygın olarak bulunmaktadır. Katyon kanallarının ( $K^+$ ,  $Na^+$  ve  $Ca^{2+}$ ) modülasyonu için önemlidir.  $\sigma 1$  reseptörleri hücre içerisinde yer değiştirebilen ve şaperon proteinleri olarak işlev görebilmektedir. Şaperon proteinleri, diğer proteinlerin sentez ve işlevleri sırasında doğru katlanmasından sorumludur (Georgiadis vd., 2017). İnositol trifosfat (IP3) reseptörü yoluyla özellikle endoplazmik retikulumdan mitokondriye  $Ca^{2+}$  sinyallerini düzenler. Hücre stres koşullarında endoplazmik retikulumdaki  $Ca^{2+}$  homeostazı bozulur ve bu durum potansiyel apoptoza direnç ile sonuçlanır. Çok sayıda çalışma kanser dahil yaşlanma ile ilişkili hastalıklarda, sigma reseptörlerinin endoplazmik retikulum stresinin bekçileri olduğu düşünülmektedir (Tesei vd., 2018).  $\sigma 1$  reseptör antagonistlerinin kaspaz bağımlı apoptozu indüklerken,  $\sigma 1$  reseptör agonistlerinin kaspaz aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir. Bu nedenle,  $\sigma 1$  reseptör antagonistleri antiproliferatif ve sitotoksik aktiviteye sahiptir;  $\sigma 1$  reseptör agonistleri anti-apoptotik ve nöroprotektiftir (Georgiadis vd., 2017).

Serbest radikalleri inaktive ederek oksidatif stres oluşumunu geciktirebilen veya önleyebilen antioksidan bileşiklere dünya çapında artan bir ilgi söz konusudur. Fenolik bileşikler bitkilerde fazla miktarda bulunan sekonder metabolitlerdir. Bitkisel ürünlerin antioksidan etkileri, içeriklerindeki fenolik bileşiklerden ileri gelmektedir. Bu ürünler serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları engelleyerek kanser, diyabet, Alzheimer ve kalp hastalıkları gibi pek çok hastalığın oluşumuna engel olur. Bitkisel kaynaklı fenolik yapıdaki bileşiklerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra prooksidan özelliklerinin bulunduğu da çalışmalar da mevcuttur (Bacanlı vd., 2015).

Kurkumin zingiberaceae bitkilerinin rizomundan ekstrakte edilen çeşitli biyolojik ve terapötik etkilere sahip doğal bir bileşiktir. Kurkumin yüzyıllar boyunca bir gıda katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda, çok sayıda çalışma birçok kanser türünün önlenmesi ve tedavisi üzerindeki potansiyel etkilerini kanıtlamıştır. Hücre kültürü ve hayvan modellerinde kurkuminin 5-FU, paklitaksel, doksorubisin, vinkristin, melfalan, bütirat, sisplatin, vinorelbin, gemsitabin, oksaliplatin ve etoposid gibi farklı kemoterapötik ajanlara duyarlılığı arttırmış olduğu da açıklanmıştır. (Wei vd., 2018; Goel ve Aggarwal 2010).

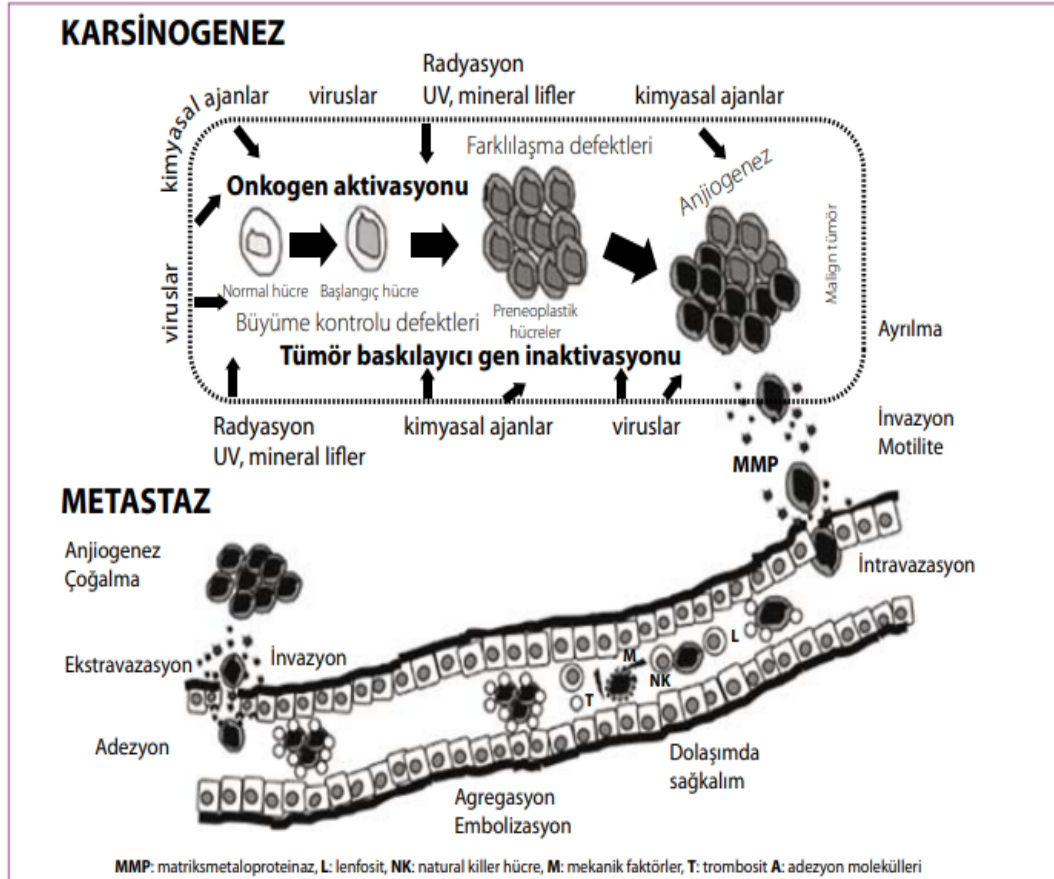
Rybczynska ve diğerleri (2008) tarafından rimkazol ile C6 glioma hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda antikanser etkisi belirlenmiştir. Happy ve diğerleri (2015) meme kanseri hücreleri üzerinde yaptığı çalışmalarda rimkazolün düşük dozlarda (4  $\mu\text{M}$ ) hücre büyümesini önemli ölçüde etkilemediği fakat belirli bir eşik konsantrasyonun üzerinde (10  $\mu\text{M}$ ) hücre sayısında azalma olduğu ve 40  $\mu\text{M}$  rimkazol ile 5 günlük muameleden sonra tüm hücre hatlarında tam hücre ölümü gerçekleştiği; ayrıca rimkazolün p53 ile kombine uygulamasında da önemli ölçüde hücre ölümlerinin arttığı belirlenmiştir. Janicke ve diğerleri (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *p*-kumarik asitin, Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Sen ve diğerleri (2013) tarafından *o*-kumarik asitin insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerinde birden fazla yolu aktive ederek antikanserojen aktivite gösterdiği belirlenmiş, yine Sen ve diğerleri (2015) tarafından *o*-kumarik asitin HepG2 hepatosellüler kanser hücreleri üzerinde doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği değerlendirilmiştir. Liu ve diğerleri (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, A549 akciğer kanseri hücreleri farklı konsantrasyonlarda kurkumin ile muamele edildikten sonra; kurkuminin bu kanser hücrelerinde büyümeyi konsantrasyon ve zamana bağlı inhibe edebileceği gösterilmiştir. Uygulanan konsantrasyona bağlı olarak tümör hücre proliferasyonu ve büyümesini inhibe ettiği yapılan testlerde gösterilmiş olan rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombine uygulamaları ile sinerjistik sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmada rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkuminin 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM ve 3.125 µM konsantrasyonlarda tekli ve kombine uygulamaları ile Caco-2, 3T3 ve A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi; CDI hesaplamaları ile rimkazol ve kombinasyonlarının agonist, antagonist, sinerjist ve additif etkilerinin değeriendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

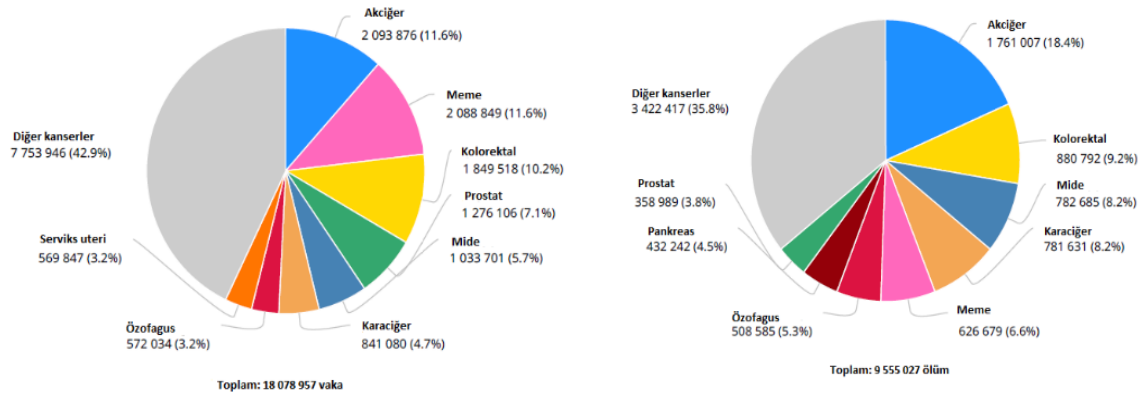
Kanser, normal bir hücrenin hücrel homeostazını kaybettiği ve hücre döngüsü, invazyon, sağkalım, metastaz ve anjiyogeneze yer alan çok sayıda genin yapısal olarak aktive edilmeye başlandığı hiperproliferatif bir hastalıktır (Shanmugam vd., 2015; American Cancer Society, 2015; Sen vd., 2013) (Şekil 2.1). Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için yalnızca kontrolsüz çoğalma yeterli değildir. Hücrenin invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi diğer malign özellikleri de kazanması gerekmektedir (Aliustaoğlu, 2009). Eğer yayılma kontrol edilmezse ölümle sonuçlanabilir. Kansere tütün, bulaşıcı organizmalar ve sağlıksız diyet gibi dış faktörler; kalıtsal genetik mutasyonlar, hormonlar ve bağışıklık durumu gibi iç faktörler neden olmaktadır. Bu faktörler birlikte veya sırayla kansere neden olur. Tedaviler arasında cerrahi, radyasyon kemoterapileri, hormon tedavisi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler (özellikle kanser hücresi büyümesini engelleyen ilaçlar) bulunmaktadır (American Cancer Society, 2015).



Şekil 2.1. Karsinogenezin oluşumu (Aliustaoğlu, 2009; İçli ve Akbulut, 2005)

Kanser, dünya çapında en sık ölüm nedeni (Momenimovahed vd., 2019) ve önemli bir halk sağlığı problemi olup Amerika Birleşik Devletleri (Siegel vd., 2019; 2020) ve dünyadaki ölümlerin kalp hastalığından sonraki (Sen vd., 2013) ikinci önde gelen sebebidir (Siegel vd., 2019, 2020; Sen vd., 2013). Kansere yakalanan kişi sayısı hızla artmakta ve Türkiye'de de her yıl mevcut kanser hastası sayısına, yaklaşık 200 bin kişi daha eklenmektedir. Ülkemizde günde 450 kişiye, her 3 dakikada bir 1 kişiye kanser tanısı konmaktadır. Türkiye'de kanser sıklığı dünya ve dünyanın gelişmekte olan ülkeleriyle benzerlikler göstermektedir. Yapılan araştırmalara göre 2030 yılında dünyada yeni vaka sayısı 27 milyon, kanser hastalığına bağlı ölüm 17 milyon ve toplam kanser hastası sayısının 75 milyon olması beklenmektedir (http-1).

Birçok araştırma dengeli diyetler, düzenli egzersiz, sigarayı bırakma, alkolü azaltma, kilo kontrolü ve stres yönetimini içeren sağlıklı hayat yaşam döngülerinin kanser riskini azaltmak için faydalı olduğu vurgulanmıştır (Park vd., 2013; Brennan vd., 1995; Pollack vd., 1984; Thaker vd., 2006; Kenfield vd., 2011; Calle vd., 2003).



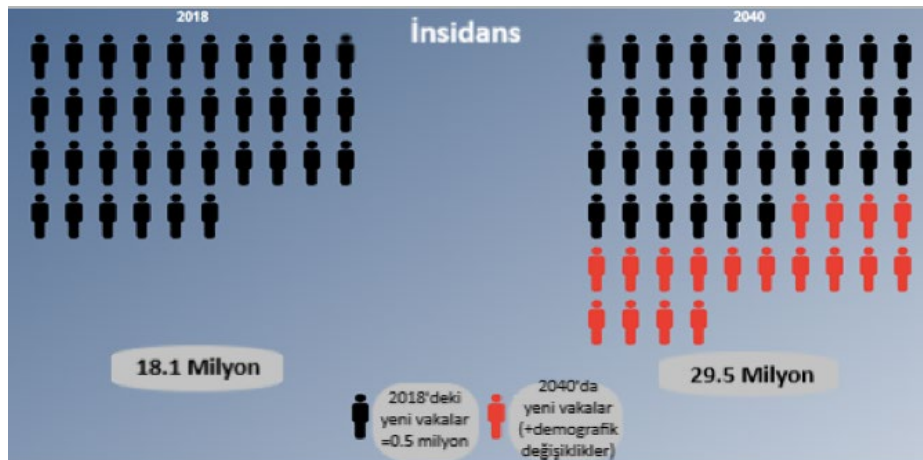
**Şekil 2.2.** Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı verilerine göre tüm kanserlerin her iki cinsiyette ve her yaşta görülen toplam vaka ve ölüm sayıları (http-2, http-3)

Dünya Sağlık Örgütü'nün açıkladığı verilerde 2018 yılında yaklaşık 18 milyon insana kanser teşhisi konulmuş ve 10 milyon civarında insan kanserden hayatını kaybetmiştir. GLOBOCAN'ın 2018 verilerine göre en sık görülen kanser türleri sırasıyla akciğer (2.1 milyon), meme (2.09 milyon), kalın bağırsak (1.8 milyon), prostat (1.3 milyon), mide (1 milyon) kanseridir. Kansere bağlı ölümlere göre ise akciğer (1.8 milyon), kolorektal (881 bin), mide (783 bin), karaciğer (782 bin) ve meme (627 bin) sıralanmaktadır (Şekil 2.2). Cinsiyete göre ise erkeklerde görülme sıklığı sırayla akciğer, prostat, kolorektal, mide, karaciğer; ölüme

bağlı olarak ise akciğer, karaciğer, mide, kolorektal, prostat şeklinde sıralanmaktadır. Kadınlarda görülme sıklığı meme, kolorektal, akciğer, serviks, tiroid; ölüme bağlı olarak ise meme, akciğer, kolorektal, serviks, mide kanserleri olarak bildirilmiştir. Dünya Kanser Araştırma Fonu verilerinde 2018'de dünyada en sık görülen kanser çeşitlerinde ilk sırada akciğer kanseri bulunmaktadır; sırasıyla meme ve kolon kanserleri, akciğer kanseri sayısını takip etmektedir. Yaklaşık 2 milyon 100 bin kişiye akciğer kanseri teşhisi ve akciğer kanseri sayısına yakın bir şekilde kolon kanseri vakası bildirilmektedir (http-4).

#### *Risk faktörleri*

- Kanser Riskini Artırdığı Bilinen Faktörler  
Sigara ve tütün kullanımı  
Enfeksiyonlar  
Radyasyon  
Organ nakli sonrası immünsüpresif ilaçlar
- Kanser Riskini Etkileyebilecek Faktörler  
Diyet  
Alkol  
Fiziksel aktivite  
Şişmanlık  
Diyabet  
Çevresel risk faktörleri (http-5)



**Şekil 2.3.** 2018'den 2040'a kadar tahmini dünya çapında gelecekteki kanser ve mortalite insidansı (http-2)

Kanser biyolojisi üzerinde yıllardır yapılan araştırmalar, hastalığı yönlendiren mekanizmalara ilişkin birtakım görüşler ortaya koymuştur. Moleküler ve diğer çalışmalardan elde edilen verilerde, belirli bir kanser türünde bile kanser davranışı ve tedaviye verdiği yanıt konusunda farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Bu yeni anlayış, kanserin büyümesi ve gelişmesinin altında yatan ve çoğunlukla proteinlerdeki spesifik değişiklikleri baz alarak hedefe yönelik tedaviler geliştirmek için adımlar atılmasını sağlamıştır. Cerrahi, radyasyon terapisi ve standart kemoterapi kanser tedavisinde önemli rol oynamaya devam edecektir. Ancak son yıllarda hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapilerin ortaya çıkması belirli kanser türlerinde hastalar için mevcut tedavi seçeneklerini genişletmiştir. Son yıllarda kanser tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da kanser teşhisi konan hastalarda konvansiyonel kemoterapi ilaçları, radyasyon tedavisi ve cerrahi ile kanser tedavisini optimize etmede en iyi sonuçların elde edilmesinde çok sayıda zorluk bulunmaktadır. Tedavi sırasında, normal dokuların zarar görmesi engellenirken öldürücü ilaç dozlarının tümörlere verilmesini incelemek için yeni kemoterapötik ajanların tanımlanması ve geliştirilmesi üzerine araştırmalara ihtiyaç vardır. Tespit edilen bazı potansiyel hedeflerin antikanser ilacın bağlanabileceği yerden yoksun olması, hedefe etkili şekilde ulaşan ya da bağlanan ilaçların tasarımı yani hedefe yönelik tedaviler geliştirmek için moleküler hedeflerin iyi tanımlanmasını gerektirmektedir ([http-6](http://6)).

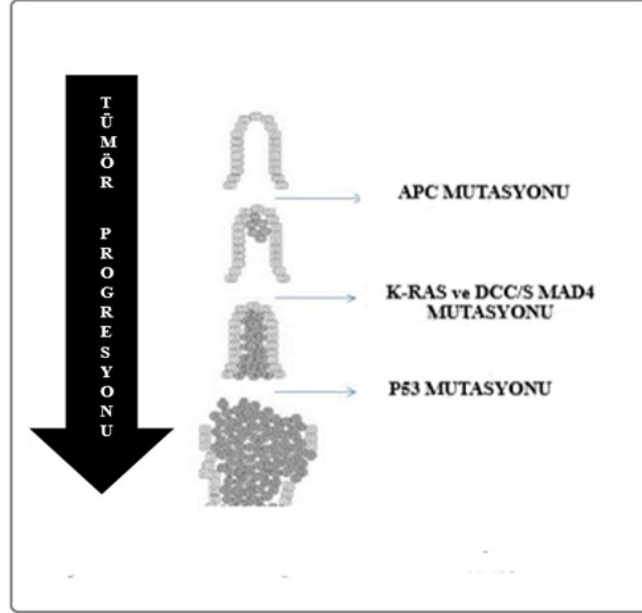
Geleneksel kemoterapi ilaçlarına veya hedefe yönelik yeni tedavilere karşı gelişen ilaç direnci, kanser tedavisinde karşılaşılan bir diğer zorluktur. İlaç direnç mekanizmalarını aydınlatmak ve üstesinden gelebilmek için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır ([http-6](http://6)).

### **2.1.1. Kolon kanseri**

Dünya çapında her yıl 1 milyondan fazla yeni kolorektal kanser vakası teşhis edilmiştir. Kolorektal kanser, dünya çapında en sık görülen üçüncü malignite ve dördüncü en sık görülen kanser mortalitesi nedenidir (Rosa vd., 2016; Terzić vd., 2010).

Kolorektal kanser gelişimi normal kolon mukozasının kolon adenokarsinomuna ve sonraki karsinoma dönüşmesine yol açan mutasyonların ya da epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanmaktadır (Rosa vd., 2016; van Breda vd., 2008). Bu mutasyonlar APC (Adenomatöz Polipozis Koli), K-ras, DCC (Deleted in Colorectal Cancer) ve P53 (şekil 2.4) gibi genleri içerir ve üç aşama ile karakterize edilir ve sonuçta preneoplastik hücrelerin malign

hücrelere kademeli olarak dönüşmesini içeren tümör oluşumu ortaya çıkar (Rosa vd., 2016; Brown vd., 2012).



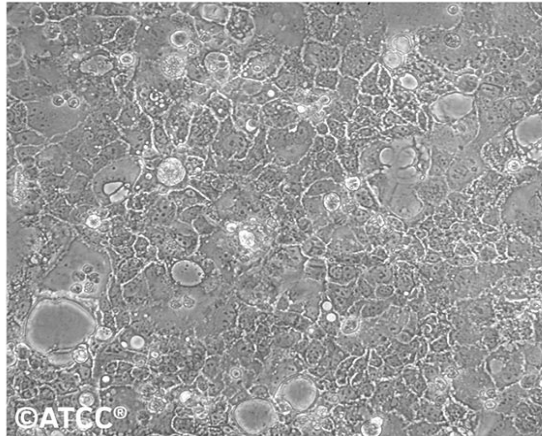
Şekil 2.4. Kolorektal kanserde belirli genlerin mutasyonu (Rosa vd., 2016)

Kolorektal kanser gelişimine çeşitli faktörler etki etmektedir. Kolorektal kanser riski yaş ile birlikte artmaktadır. Genetik yatkınlık, diyet, obezite, fiziksel inaktivite, uzun süreli sigara kullanımı, düşük kalsiyum alımı, tip-2 diyabet ve hayat tarzının kolorektal kanser gelişimi için önemli katkıda bulunan faktörlerden bazıları olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Rosa vd., 2016; Henning vd., 2013; American Cancer Society, 2015). Tam tahıllı lif (American Cancer Society, 2015), sebze ve meyve tüketimi özellikle kolorektal kanser için düşük risk ile ilişkilendirilmekte (Rosa vd., 2016; ‘American Cancer Society, 2015) olup, bu da gıdaların fitokimyasal içerikleri ile ilişkilidir. Fitokimyasalların, özellikle de fenolik bileşiklerin kanser önleyici, antiviral, antioksidan ve antienflamatuar aktiviteler gibi önemli biyolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Rosa vd., 2016).

Kolon kanseri, kadın ve erkeklerde en yaygın üçüncü önde gelen kanserdir (American Cancer Society, 2015) ve her yıl 500.000 ölümle sonuçlanmaktadır. Her yıl yaklaşık 1 milyon yeni vaka teşhis edilmektedir. Agresif tedavilere rağmen birçok tümör mevcut tedavi protokollerine karşı dirençlidir ve epidemiyolojik veriler diyetin kolon kanseri etiyolojisinde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir (Rosa vd., 2018).

### 2.1.1.1. *Caco-2 hücre hattı*

1970'lerde gastrointestinal tümörlerden birkaç epitel hücre dizisi elde edilmiştir. Kanser gelişimindeki mekanizmaları ve sitoterapinin etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Kısmen primer bağırsak epitel hücrelerinin hem morfoloji hem de işlev, yani ince bağırsak enterositleri, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreleri, Paneth hücreleri ve M-hücrelerinin heterojenliği nedeniyle, tümör hücrelerinin daha özelleşmiş hücre tiplerine ayrılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Hücre hatlarının birkaçı, ortama sentetik veya biyolojik faktörlerin ilave edilmesiyle kısmen ayırt edilebimiştir. Bununla birlikte, bunlardan biri olan Caco-2, birleşme noktasına ulaştığında kendiliğinden farklılaşabildiğinden oldukça benzersiz bir özellik göstermiştir. Caco-2 (*Cancer coli-2*) (Şekil 2.5) Slogen-Kettering Kanser Araştırma Enstitüsü'nde Jorgen Fogh tarafından bir insan kolorektal adenokarsinomundan oluşturulmuştur (Lea, 2015; Fogh vd., 1977).



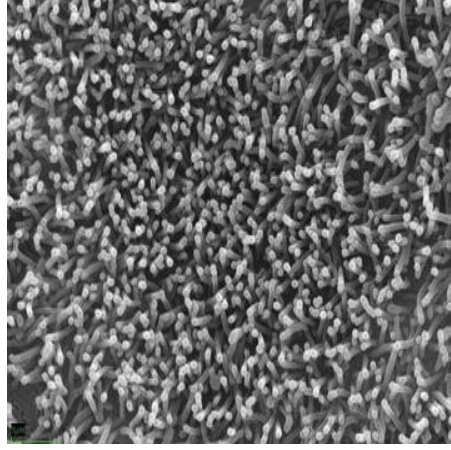
Şekil 2.5. *Caco-2 hücreleri* (<http-7>)

İnsan epitel hücre hattı Caco-2, bağırsak epitelyal bariyerinin bir modeli olarak yaygın kullanılmaktadır. İlk çalışmalar farklılaştırılmış Caco-2 hücrelerinin ince bağırsak enterositlerinin karakteristik fonksiyonel özelliğini ifade ettiğini ortaya koymuştur. Birleşmeye doğru karakteristik bir apikal fırçamsı kenar mikrovillus edinerek kutuplaşmaya başlarlar. Bitişik hücreler arasındaki sıkı bağlantılar oluşturulur, bunlar da enterositlere özgü enzim aktivitelerini, yani laktaz, aminopeptidaz N, sükras-izomaltaz ve dipeptidilpeptidaz IV eksprese eder. Bununla birlikte kolonosit belirteçleri Caco-2 hücrelerinde de bulunur (Lea, 2015; Engle vd., 1998) (Tablo 2.1). Fakat, hiçbir P-450 metabolize edici enzim aktivitesi rapor edilmemiştir (Lea, 2015).

**Tablo 2.1.** *Caco-2 hücrelerinin özellikleri (Lea, 2015)*

|                                           |                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Büyüme</b>                             | Epitel hücrelerinin yapışkan bir tek tabakası olarak kültürde çoğaltılır.                                                                                                                                         |
| <b>Farklılaştırma</b>                     | Standart kültür koşullarında 14-21 gün sonra                                                                                                                                                                      |
| <b>Hücre morfolojisi</b>                  | Apikal tarafta sıkı kavşaklara ve fırça kenarlığına sahip polarize hücrelerdir.                                                                                                                                   |
| <b>Elektriksel parametreler</b>           | Yüksek elektrik direncine sahiptirler.                                                                                                                                                                            |
| <b>Sindirim enzimleri</b>                 | İnce bağırsağın tipik sindirim enzimlerini, membran peptidazlarını ve disakkaridasyonlarını (laktaz, aminopeptidaz N, sükras-izomaltaz ve dipeptidilpeptidaz IV) eksprese ederler.                                |
| <b>Aktif taşıma</b>                       | Amino asitler, şekerler, vitaminler, hormonlar                                                                                                                                                                    |
| <b>Membran iyonik taşıma</b>              | $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ ATPaz}$ , $\text{H}^+/\text{K}^+ \text{ ATPaz}$ , $\text{Na}^+/\text{H}^+$ değişimi, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ kotransport, apikal $\text{Cl}^-$ kanallara sahiptirler. |
| <b>Membran iyonik olmayan taşıyıcılar</b> | Geçirgenlik glikoprotein (P-gp, çoklu ilaç direnci proteini), çoklu ilaç direnci ilişkili protein, akciğer kanseri ile ilişkili direnç proteini bulunur.                                                          |
| <b>Reseptörler</b>                        | B12 vitamini, D3 vitamini, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü), şeker taşıyıcılar (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5, SGLT1) bulunur.                                                                              |
| <b>Sitokin üretimi</b>                    | IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , TGF-21, timik stromal lenfopoietin (TSLP), IL-15 üretirler.                                                                                                                            |

İnsan bağırsağı Caco-2 (Şekil 2.6) hücre hattı son yirmi yıl boyunca bağırsak bariyerinin bir modeli olarak yaygın kullanılmıştır. Başlangıçta bir insan kolon adenokarsinomundan edinilen ana hücre dizisi, kültürde tek katmanlı bir hücre oluşumuna yol açan kendiliğinden farklılaşma sürecine maruz kalır, olgun enterositin birkaç morfolojik ve fonksiyonel özelliğini ortaya çıkarır. Kültüre bağlı koşulların kısmen ana hücre dizisinin heterojenliğine bağlı olarak bu özelliklerin ekspresyonunu etkilediği ve hücrelerin alt popülasyonlarının kültürde ön plana çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca birçok kolon hücre dizisi ana diziden izole edilmiştir, bu da genel olarak farklılaşma özelliklerinin daha homojen bir ifadesini sergiler, ancak her zaman ana dizinin bütün özelliklerini ifade etmez (Sambuy vd., 2005).



**Şekil 2.6.** 21 günlük kültür sonrası polarize Caco-2 hücrelerinin SEM (scanning electron microscope) görüntüsü (Lea, 2015)

### 2.1.2. Akciğer kanseri

Akciğer kanseri dünyadaki hem erkek hem de kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (Townsend vd., 2017; American Cancer Society, 2015). Sigara içmek, bu kanser türü için en önemli risk faktörüdür. Hem sigara içme miktarı hem de süresi ile risk artmaktadır. Diğer risk faktörleri asbest (özellikle sigara içenler), bazı metaller (arsenik, krom, kadminyum), bazı organik kimyasallar, radyasyon ve hava kirliliğidir. Hastalık gelişimi özellikle genç yaşta olanlarda genetik duyarlılık, akciğer kanserinin gelişiminde rol oynamaktadır (American Cancer Society, 2015).

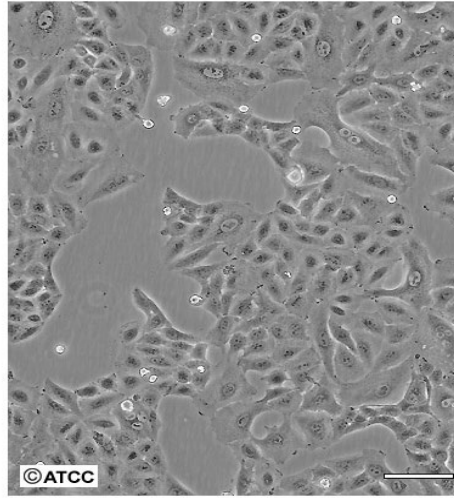
Akciğer kanseri hastalarının 1 yıllık sağkalım oranı %44.5 yıllık sağkalım oranı ise sadece %17'dir. Düşük sağkalım oranı, büyük ölçüde ileri evre tanılara bağlanmaktadır. Hastaların yaklaşık %57'si ileri evrede teşhis edilmektedir, bu da tedavi seçeneklerinin azalmasına ve mortalitenin artmasına yol açar. İleri evrede tanı koyulduğunda hastaların 1 yıl ve 5 yıl için sağkalım oranları sırasıyla %26 ve %6'ya düşmektedir (Townsend vd., 2017; American Cancer Society, 2015).

Akciğer kanserinin erken tespitinin hastanın hayatta kalması için önemli olduğundan özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerini tanımlayan invaziv olmayan testleri geliştirmek ve hastalığı daha erken bir aşamada teşhis etmek için çalışmalar devam etmektedir. Dolaşımdaki biyomarkerları bulmak için kanser dokularının profillenmesi tümör kaynaklı proteinlerin belirlenmesinde yardımcı olsa da, bu yöntemler son derece invazivdir. Sonuç olarak, araştırmacılar hastaların balgamındaki kanser biyomarkerları belirlemek için teknikler

geliştirilmiştir. Hasta panelleri değerlendirilerek, daha sonra erken akciğer kanseri tespitinde hekimlere yardımcı olabilecek referans olarak kullanılabilecek kanser profilleri oluşturulmuştur. Bu yöntemler akciğer kanserinin erken fark edilmesi için umut verici olsa da, hastaların tedavisi için uygun değildir (Townsend vd., 2017).

#### 2.1.2.1. A549 hücre hattı

A549 hücre dizisi (Şekil 2.7) 1973 yılında 20 farklı tümörden sürekli hücre dizileri oluşturmaya yönelik bir çalışmada pulmoner adenokarsinomdan izole edilmiştir. A549 hücre dizisi insan akciğerinin Alveolar Tip II pnömositlerini temsili şeklinde karakterize etmektedir. Hücre dizisinin izole edilmesinden kısa bir süre sonra A549 ile yapılan çalışmalarda, ATII epitel hücre fenotipinin özelliklerini sergiledikleri de açıklanmıştır (Giard vd., 1973; Shapiro vd., 1978; Lieber vd., 1976; Foster vd., 1998; Nardone ve Andrews, 1979; Balis vd., 1984; Swain vd., 2010; Corbière vd., 2011; Cooper vd., 2016) (<http-8>).



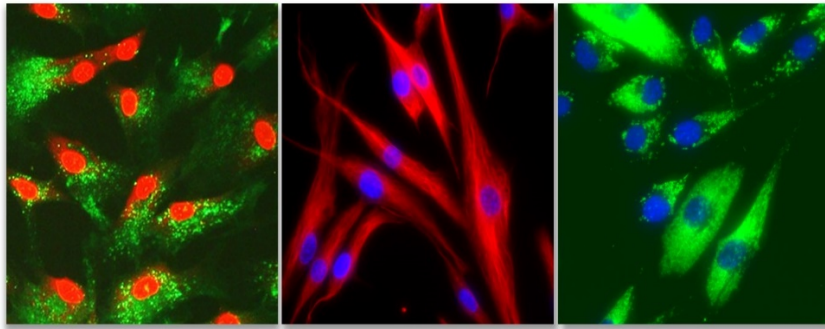
Şekil 2.7. A549 hücreleri (<http-7>)

Kanser araştırması, hava yolu fonksiyonu ve hastalığı ve virolojisi ile ilgili çalışmalar için distal akciğerin epitel modellerinin oluşturulmasıyla; A549 hücre dizisi, adenovirüsler de dahil olmak üzere birçok insan solunum yolu virüsü için uygun bir konaktır (Giard vd., 1973; Shapiro vd., 1978; Lieber vd., 1976; Foster vd., 1998; Nardone ve Andrews, 1979; Balis vd., 1984; Swain vd., 2010; Corbière vd., 2011; Cooper vd., 2016) (<http-8>).

## 2.2. Fibroblast hücreleri

Bağ dokusu hücreleri hemen hemen her doku ve organın desteklenmesinde ve onarımında merkezi bir rol oynar. Bağ dokusu hücreleri fibroblastları, kıkırdak hücrelerini, kemik hücrelerini, yağ hücrelerini ve düz kas hücrelerini içerir. Bazı fibroblast hücreleri, dokunun üyelerinden herhangi birine dönüşebilir. Bağ dokusu hücre tipinin bu dönüşümleri, çevredeki hücre dışı matrisin bileşimi, hücre şekli, hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (Alberts vd., 2002).

Fibroblastlar (Şekil 2.8) bağ dokusunda dağıtılırlar, tip I ve/veya tip III kollajen açısından zengin rijit bir hücre dışı matris salgırlar. Bir doku yaralandığında yakınlardaki fibroblastlar çoğalır, yaralanan ve hasarlı dokuyu izole ederek onarmaya yardımcı olan büyük miktarlarda kollajen matris üretir. Yaralanma karşısındaki yetenekleri, yalnız yaşam tarzlarıyla birlikte fibroblastların neden kültürde büyümek için en kolay hücre olduğunu açıklayabilir. Bu da onları hücre biyolojik çalışmaları için favori bir konu haline getirmiştir (Alberts vd., 2002).



Şekil 2.8. Fibroblast hücreleri (<http-9>)

### 2.2.1. NIH/3T3 hücre hattı

NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast hücreleri, 1962 yılında New York Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında izole edilen bir hücre hattından başlatılmıştır. 3T3 hücre transferi ve aşılama protokolü hattı ve araçlar anlamına gelir “3 günlük transferi, inokulum,  $3 \times 10^5$  hücre” bu protokol kullanılarak ölümsüz hücre hattı yaklaşık 20-30 nesil *in vitro* büyümeye, hücre kültüründe gelişmeye ve stabilize etmeye başlanmıştır. George Todaro ve bu hücre hattını ilk kültürleyen bilim adamları Howard Green, hücreleri ayrıştırılmış NIH İsviçre fare embriyo fibroblastlarından almıştır. O zamandan beri standart bir fibroblast hücre

hattı haline gelmiştir (http-10).

En yaygın olarak kullanılan hücre dizilerinden biri olarak, NIH/3T3 hücre dizisi, protein fonksiyonel analizi de dahil olmak üzere bir dizi mekanik ve hücre bazlı tahliller için çalışmalara dahil edilmiştir. Hücrelerin morfolojisi yapışık, fibroblastiktir ve büyümesi nispeten kolay hücre çizgileri arasında kabul edilmektedir (http-10).

Orijinal hücre aşırı temasla inhibe edilir, ancak hücre hattı artık inhibe edilmez. NIH/3T3 hücreleri, poliomavirüs ve SV40 ile transformasyona açıktır. Ayrıca, 3T3 hücreleri sarkom virüsü odak oluşumu ve lösemi virüsüne duyarlıdır; temazepam ve diğer benzodiazepinler tarafından inhibe edilir (http-10).

NIH/3T3 hücrelerinin sayısı 20-26 saatlik bir hızla 2 katına çıkmaktadır ve plastik bir şişede kültürlenmelidir (yani belirli cam türlerine iyi yapışmazlar). NIH/3T3 hücrelerinin kültür ortamı %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ilavesiyle formüle edilen Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'dir. Şişeler 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içinde inkübe edilmelidir (http-10).

### **2.3. Rimkazol**

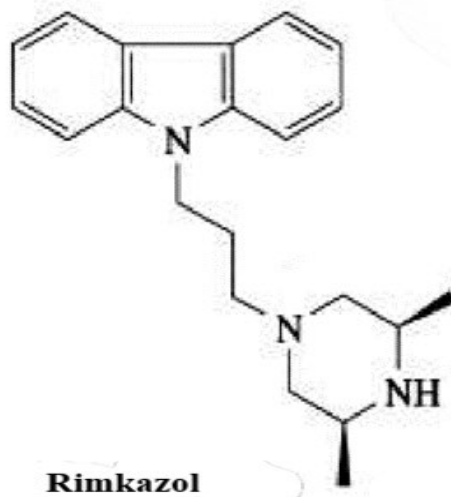
Rimkazol, kısmen  $\sigma$  reseptör antagonisti olan bir karvazol türevidir. Wellcome Araştırma Laboratuvarları bu bileşiği, daha iyi bir yan etki profiline sahip yeni bir antipsikotik olduğu varsayılarak 1980'lerde ortaya çıkardı. Ancak sonraki klinik deneyler rimkazolün şizofreni hastalarında etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Şu an ağırlıklı olarak deneysel bir araç olarak kullanılmaktadır. Bir  $\sigma$  reseptör antagonisti olarak eylemlerine ek olarak, rimkazol dopamin taşıyıcıları için yüksek afiniteye sahiptir ve son yıllarda yeni dopamin taşıyıcı ligandların geliştirilmesinde öncü bir bileşik olarak hizmet etmiştir. Her ne kadar rimkazol  $\sigma$  reseptörleri için seçici bir ligand olarak düşünülemese de  $\sigma$  reseptörleri için diğer seçici agonistlerin ve antagonistlerin yakın zamandaki gelişimi, bu reseptörlerin rimkazolün etkilerine katılımının açıklığa kavuşturulmasına yardımcı olmuştur (Gilmore vd., 2004).

Martin ve diğerleri,  $\sigma$  reseptörlerinin varlığını ilk olarak 1976 yılında SKF 10.047'nin (N-alillnormetazosin) psikotomimetik etkilerinin aracılık ettiği yer olarak varsaymıştır (Gilmore vd., 2004; Martin vd., 1976). O zamandan beri reseptörlerin fizyolojik işlevlerini tanımlamak için bir dizi çalışma yapılmıştır. Çalışmalar,  $\sigma$  reseptörlerinin çevresel ve merkezi sinir sisteminde bilinen herhangi bir reseptörden farklı bir düzende dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur. Beyinde özellikle motor ve limbik sistemlerde lokalizedir (Gilmore vd., 2004; Walker vd., 1990) ve  $\sigma$  reseptörleri periferde kalp, dalak, karaciğer, sindirim sistemi, testisler,

yumurtalıklar, kan mononükleer hücreleri ve vas deferente (Gilmore vd., 2004; Maurice vd., 2002; Monassier ve Bousquet, 2002; Vaupel ve Su, 1987) yaygın olarak yer almaktadır.  $\sigma$  reseptörleri göğüs, kolon, akciğer, nöral, prostat ve cilt tümör hücre dizileri de dahil olmak üzere tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Ayrıca bu reseptörler çoğalan tümör hücrelerinde özellikle yüksek oranda bulunmaktadır. Biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalar çoklu  $\sigma$  reseptör alt tiplerinin varlığını göstermiştir ve en iyi karakterize edilenler ise  $\sigma_1$  ve  $\sigma_2$  reseptörlerdir (Gilmore vd., 2004).

Sigma reseptörleri, meme, akciğer ve prostat kanseri hücrelerinde yüksek oranda bulunduğundan bu reseptörlerin tümör büyümesinden sorumlu olduğu açıklanmıştır. Ayrıca, sigma reseptör ekspresyon derecesi ile tümör agresivitesi arasında bir bağlantı olduğu ve yüksek metastatik potansiyeli olan kanser hücrelerinde sigma reseptörlerinin yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (Rui vd., 2016).

İki ana  $\sigma$  reseptörü alt tipinden rimkazolün  $\sigma_2$  reseptörlerine olan afinitesi,  $\sigma_1$  reseptörlerine göre 2 ila 3 kat daha fazladır. Özet olarak rimkazol (Şekil 2.9) tarihsel olarak seçici  $\sigma$  reseptör ligandı olarak bilinmektedir. Ancak çalışmalar,  $\sigma$  reseptörlerine olan afinitesinin orta düzeyde olduğunu göstermiştir.  $\sigma$  reseptörleri ile etkileşime ek olarak, rimkazol serotonin taşıyıcıları için benzer, dopamin taşıyıcıları için de daha yüksek bir afiniteye sahiptir (Gilmore vd., 2004).



**cis-9-[3-(3,5-dimetil-1-piperazin)propil]karbazol**

**Şekil 2.9.** Rimkazolün kimyasal yapısı (Gribble, 1996)

Rimkazolün yapılan biyoanalizlerde çeşitli etkilere sahip olduğu görülmüştür. Kısmen kullanılan bileşiğin konsantrasyonuna bağlı olarak hem agonist hem de antagonist etkiler gösterebilmektedir. Genel olarak antagonist etkilerin biyolojik aktiviteden yoksun olduğu daha düşük rimkazol konsantrasyonlarında ( $< 10\mu\text{M}$ ) görülmektedir. Fonksiyonel çalışmalarda rimkazolün seçici bir  $\sigma$  reseptör agonistinin (örn: 1,3-di-o-toliguanidin, DTG) veya en az iki  $\sigma$  reseptörlerine seçici olmayan yüksek afiniteli agonistlerinin eylemlerini antagonize ettiğinde ya da yüksek afiniteli ve/veya seçiciliğe sahip başka bir  $\sigma$  reseptör antagonisti benzer etkiler yarattığında reseptör antagonisti görevi gördüğü düşünülmüştür (Gilmore vd., 2004).

Rimkazolün diğer seçici  $\sigma$  reseptör agonistleriyle karşılaştırılabilecek kendi fonksiyonel etkilerini yarattığında veya fonksiyonel etkileri başka  $\sigma$  reseptör antagonistleri tarafından antagonize edildiğinde ise agonist görevi gördüğü düşünülmüştür (Gilmore vd., 2004).

Antagonist etki gösterdiği konsantrasyonlarında rimkazol kendi başına herhangi bir etki yaratmaz, ancak DTG, (+)-pentazosin ve (+)-SKF 10.047 gibi  $\sigma$  reseptör agonistleri tarafından üretilen kontraktilitedeki değişiklikleri önler. Bununla beraber rimkazol, genelde bu periferel dokularda elektriklerle tetiklenen kontraksiyonları engellemek için daha yüksek konsantrasyonlarında biyolojik aktiviteyi kendi başına ortaya çıkarır (Gilmore vd., 2004).

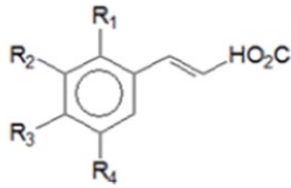
Happy ve diğerlerinin (2015), MCF-7, T47D, MDA-MB-231 ve MDA-MB-157 meme kanseri hücreleri üzerinde yaptığı çalışmalarda rimkazolün düşük dozlarda ( $4\mu\text{M}$ ) hücre büyümesini önemli ölçüde etkilemediği fakat belirli bir eşik konsantrasyonun üzerinde ( $10\mu\text{M}$ ) hücre sayısında azalma olduğu ve  $40\mu\text{M}$  rimkazol ile 5 günlük muameleden sonra tüm hücre hatlarında tam hücre ölümü gerçekleştiği; ayrıca rimkazolün p53 ile kombine uygulamasında da önemli ölçüde hücre ölümlerinin arttığı belirlenmiştir (Happy vd., 2015).

#### **2.4. Fenolik Asitler (*p*-Kumarik Asit ve *o*-Kumarik Asit)**

Son zamanlarda meyve, sebze ve bitkilerden elde edilmiş 5000'den fazla fitokimyasal tanımlanmıştır. Bitkilerdeki başlıca fitokimyasallar; fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, stilbenler, kurkuminoidler, kumarinler, lignanlar, kinonlar gibi farklı bileşikler grubunu temsil eden fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler arasında fenolik asitler en basit yapıya sahip olan gruptur. Birçok meyve, sebze, tahıl ve tıbbi bitkide bulunan ve flavonoid olmayan polifenolik bileşiklerdir. Bu nedenle, bu fenolik asitlerin diyetle ilgili 25 mg ile 1 g/gün arasında değişen alımı oldukça yüksektir (Sen vd., 2015).

Fenolik asitler genellikle iki ana gruba ayrılır; yedi karbon atomu içeren benzoik asitler ve (C6-C1) ve dokuz karbon atomu içeren sinnamik asitler (C6-C3) (Teixeira vd., 2013; Sen vd., 2015). Bu bileşikler baskın olarak hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler (Tablo 2.2) olarak bulunur, serbest veya konjuge formlarında ortaya çıkabilir (Teixeira vd., 2013).

**Tablo 2.2.** Hidroksisinamik asit türevlerinin kimyasal yapısı (Rosa vd., 2016; Yeh ve Yen, 2003)



| Radikal                        | Hidroksisinamik Asit   |
|--------------------------------|------------------------|
| $R_1=R_2=R_3=R_4=H$            | Sinnamik asit          |
| $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$        | <i>o</i> -Kumarik asit |
| $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$        | <i>p</i> -Kumarik asit |
| $R_1=R_2=H, R_3=R_4=OH$        | Kafeik asit            |
| $R_1=R_2=H, R_3=OH, R_4=OCH_3$ | Ferulik asit           |
| $R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$ | Sinapik asit           |

Fenolik asitlerden olan kafeik, kumarik ve ferulik asit birçok bitkide bulunmaktadır; bunların tümör hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve artmış antioksidan aktiviteyle tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Bouzaiene vd., 2015).

*p*-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitler (Tablo 2.2) gibi hidroksisinamik asitlerin doğada önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Hidroksisinamik asitler, amidler (mono- veya poliaminler, amino asitler veya peptitlerle konjüge edilmiş), esterler, özellikle de tartarik asit, şeker türevleri ve glikozitler gibi hidroksiasit esterleri de dahil olmak üzere birçok konjüge edilmiş formda bulunan sekonder metabolitlerdir. Sinnamat esterleri yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunurken, sinnamik asitlerin amidleri nadir görülür (Teixeira vd., 2013). *p*-Kumarik asit, sinnamik asidin yaygın bulunan izomeri olup fındık, domates ve havuç gibi birçok yenilebilir bitkilerde bulunur. *p*-Kumarik asidin tümör karşıtı ve mutajenik aktiviteye sahip

olduğu bildirilmiştir (Jaganathan vd., 2013).

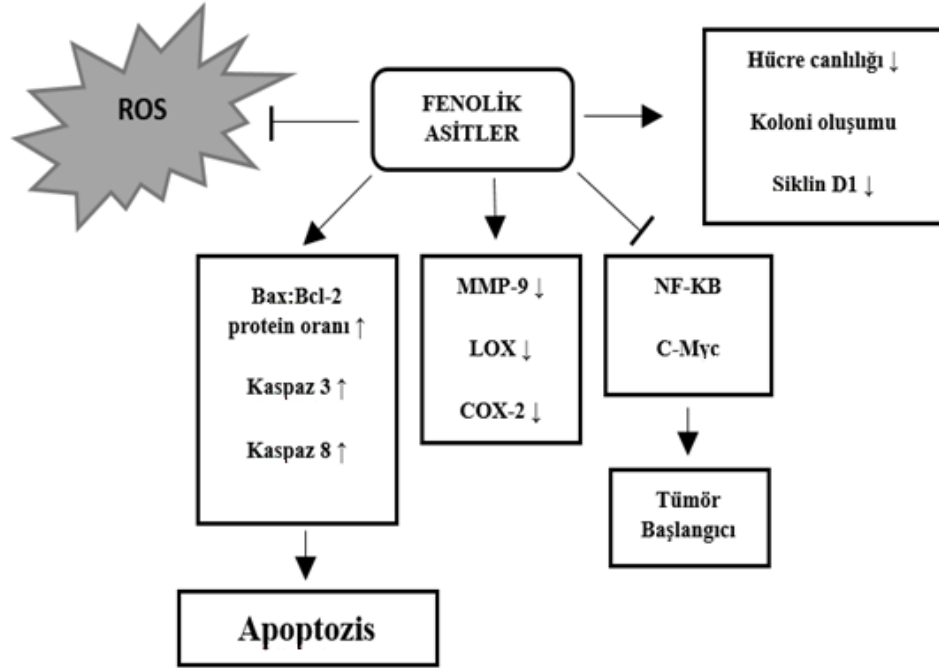
Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *p*-kumarik asidin kolon epitel hücrelerine (Caco-2) etkisi araştırılmıştır. 1500 µmol/l konsantrasyonda *p*-kumarik asitin 24-72 saatlik uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinin çoğalmasını %43-%75 oranında önlediği bulunmuştur. Bununla birlikte, *p*-kumarik asitin kolon kanseri hücrelerinde apoptoz mekanizmasını tasvir etmez (Jaganathan vd., 2013).

Janicke ve diğerleri (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ferulik asit ve *p*-kumarik asitin, Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve hücre döngüsü faz dağılımı üzerindeki etkileri (Tablo 2.3) araştırılmıştır. Hücreleri 1500 µM ferulik asit ile muamele ettikten 2 ve 3 gün sonra Caco-2 hücre canlılığının kontrole göre sırasıyla %75 ve %43 oranında azaldığını belirlemişlerdir. Aynı şekilde Caco-2 hücreleri 1500 µM *p*-kumarik asit ile muamele edildikten 2 ve 3 gün sonra hücre sayısı kontrole göre sırasıyla %74 ve %55 oranında azalmıştır. Her iki fenolik asit ile 1 gün sonra G<sub>1</sub> fazındaki azalma, S fazında artış; 2 ve 3. günlerde G<sub>2</sub> fazında artış belirlenmiştir (Rosa vd., 2016; Janicke vd., 2005).

**Tablo 2.3.** *p*-Kumarik asitin antikanser etkileri (Rosa vd., 2016; Janicke vd., 2005; 2011)

| Hücre/Hayvan Modeli | Fenolik Asitler ve Türevleri | Antikanser Etkiler                                    |
|---------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Caco-2              | ferulik asit;                | Hücre canlılığı ↓                                     |
|                     | <i>p</i> -kumarik asit       | G <sub>1</sub> fazı ↓ ; S ve G <sub>2</sub> fazları ↑ |
| Caco-2              | ferulik asit;                | Hücre çoğalmasını düzenleme;                          |
|                     | <i>p</i> -kumarik asit       | Hücre döngüsünü düzenleme                             |

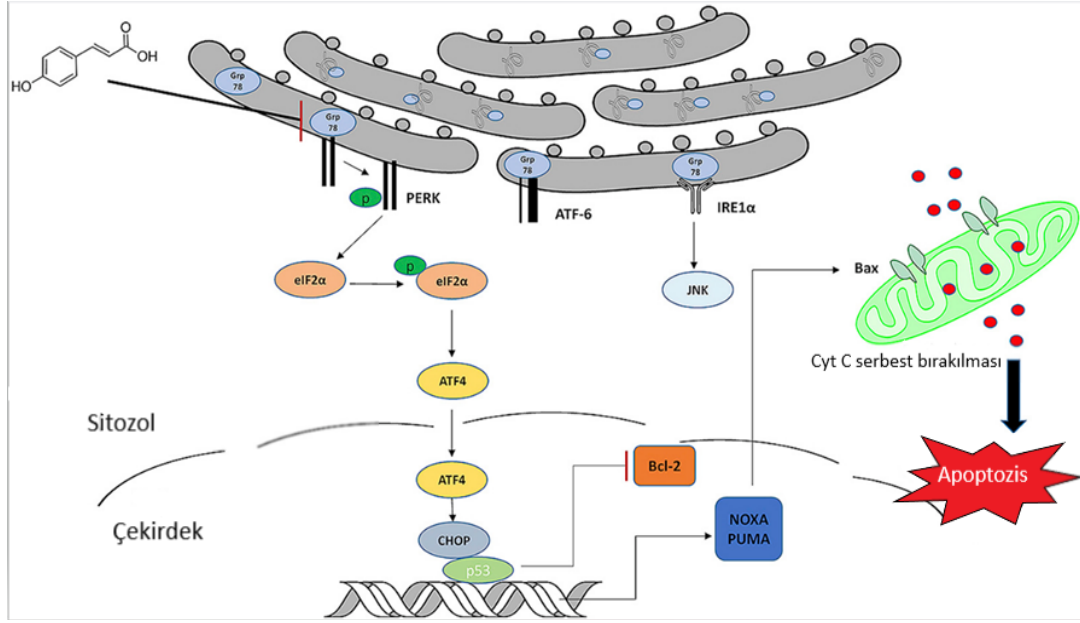
Fenolik asitlerin antikanser özellikleri olduğu açıklanmasına rağmen, hücresel mekanizmalar üzerindeki etkileri hala araştırılmaktadır. Ancak serbest radikallerin atılması, ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin indüksiyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, DNA hasar onarımında, hücre proliferasyonunda, apoptoz ve invazyondaki hücre sinyal yollarının modülasyonunda (Şekil 2.10) önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Fenolik asitlerin, inflamasyon, proinflamatuvar sitokinler, COX-2, lipooksijenazlar (LOX) (Şekil 2.10), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini inhibe ettiği bildirilmiştir (Rosa vd., 2016; Rosa vd., 2018).



Şekil 2.10. Kolon kanserinde fenolik asitlerin antikanser mekanizması (Rosa vd., 2016)

Hidroksisinamik asitlerin oksidatif stres ile ilgili çeşitli hastalıklarda (örn. ateroskleroz, inflamatuvar yaralanma, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar) önleyici ve/veya terapötik amaçlar için kullanılabileceği gösterilmiştir. En önemli antioksidan etki mekanizmasının, hidrojen veya elektron verici kabiliyetleri ve sonuçta meydana gelen fenoksil radikallerinin stabilitesiyle bağlantılı olan radikal atma aktivitesi yoluyla olduğu varsayılmaktadır (Teixeira vd., 2013).

*p*-Kumarik asit hem *in vitro* hem de *in vivo* kolon kanseri modellerinde Grp (Glucose Regulated Protein) down-regüle etmiş, UPR aracılı apoptozu da aktive etmiştir. Ayrıca *p*-kumarik asitin sitokin COX-2, IL-6, TNF-α ve PGE2 ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu önemli ölçüde azalttığını ve ayrıca western blot yöntemiyle analiz edildiği üzere p-p65 ve p-IκBα ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, *p*-kumarik asitin apoptoz indükleyici etkisi sonucunda PERK-eIF2α-ATF-4-CHOP yolunun aktivasyonu yoluyla (Şekil 2.11) kanser hücrelerinde Grp78 (78 kDa Glucose Regulated Protein) up-regülasyonunu inhibe ettiği açıklanmıştır (Sharma vd., 2018).



Şekil 2.11. *p*-Kumarik asitin antikanser etkisinin moleküler mekanizması (Sharma vd., 2018)

Yapılan bir çalışmada kafeik, kumarik ve ferulik asitin insan akciğer (A549) ve kolon (HT29-D4) kanser hücrelerinin proliferasyonunu, doza bağlı bir şekilde 50-1000  $\mu$ M konsantrasyon aralığında önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür (Bouzaiene vd., 2015).

Bu fenolik asitlerin A549 insan akciğer kanseri ve HT29-D4 kolon adenokarsinom hücrelerinin adezyonu üzerinde etkileri araştırılmış, A549 ve HT29-D4 hücrelerinin kafeik, kumarik ve ferulik asitin konsantrasyonuna bağlı olarak tip I kollajene bağlanmalarının engellendiği ve hücre adezyonunun sırasıyla %77.9 ile %79.8 oranında azaldığı gösterilmiştir (Bouzaiene vd., 2015).

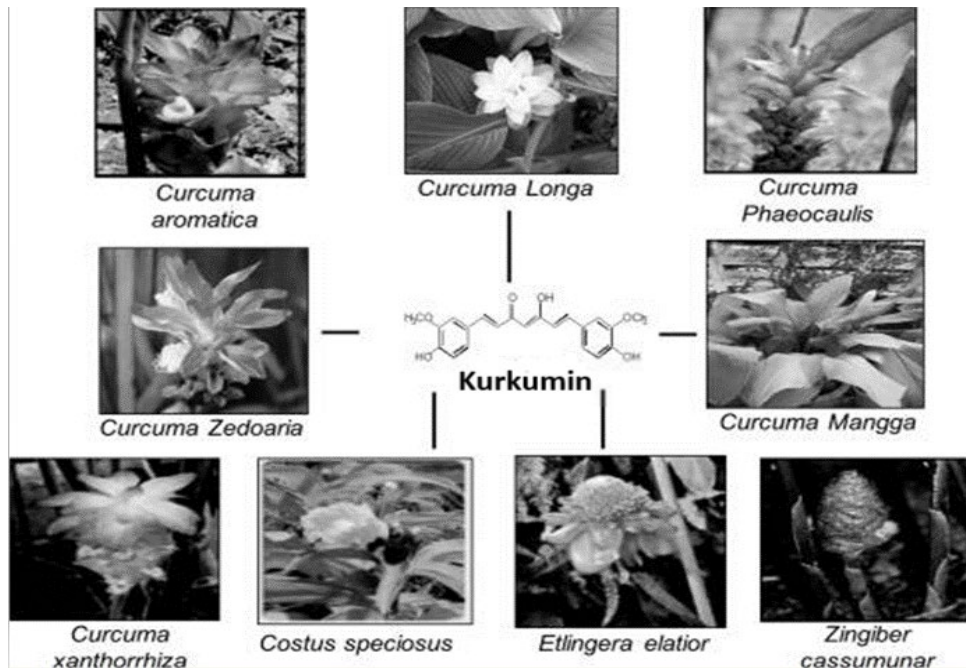
Hidroksisinamik asitlerden kafeik, ferulik, *m*- ve *p*-kumarik asitlerin antioksidan, antifibröz, antiviral, antitümör, antitrombotik biyolojik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi görmesine rağmen; *o*-kumarik asitin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır (Sen vd., 2013).

*o*-Kumarik asit çay, kahve, fındık, *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (Compositae), *Mikania glomerata* Spreng, *Medicago sativa* L. (Leguminosae), *Caucalis platycarpus* L. (Apiaceae) ve *Urtica urens* gibi birçok gıda ve bitkide bulunan bir hidroksisinamik asittir. Yapılan çalışmalar *o*-kumarik asitin antilipidemik, antioksidan ve antikanserojen gibi farklı biyolojik aktivitelerinin olduğunu göstermiştir (Sen vd., 2015).

## 2.5. Kurkumin

Zerdeçal, eski tıbbi metinlerde ve geleneksel Çin tıbbında birçok hastalıkların önlenmesi ve iyileştirilmesinde yararlı olduğu bilinen *Curcuma longa* Linn bitkisinden bir rizomdur. Zerdeçal tozu sarı pigmentlidir; kurkumin (%77), dimetoksikurkumin (%17) ve bismetoksikürümin (%3) içeren çok sayıda kurkuminoide sahiptir. Kurkumin bir polifenoldür (1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1, 6 heptadien-3,5-dion) (Shanmugam vd., 2015; Ammon ve Wahl, 1991).

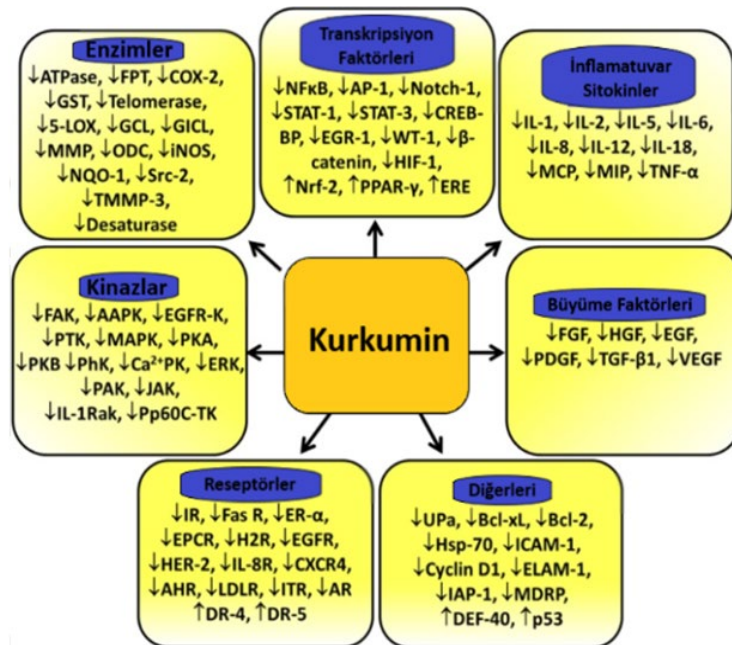
Kurkumin *Curcuma mangga*, *Curcuma zedoaria*, *Costus speciosus*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma aromatic*, *Curcuma phaeocaulis*, *Etlingera elatior* ve *Zingiber cassumunar* gibi diğer *Curcuma* türlerinden elde edilmiştir (Shanmugam vd., 2015; Aggarwal vd., 2007) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Kurkuminin kimyasal yapısı ve biyolojik kaynakları (Shanmugam vd., 2015; Park vd., 2013; Aggarwal vd., 2007)

*Curcuma longa*'dan üç polifenol izole edilmiş olup, bunlardan kurkumin (bis-a,β-doymamış β-diketon) en çok, güçlü ve kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Park vd., 2013; Amin vd., 2009). Kurkumin, farklı kültürlerdeki birçok hastalık için ampirik ilaç olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda antikanser etkileri olduğu açıklanmıştır (Park vd., 2013; Kuttan vd., 1987).

Son on yıldır kurkumin hakkında yaklaşık 6850 yayınlı yapılan kapsamlı araştırmalar tıbbi ve sağlık yararları hakkında oldukça fazla bilgi vermiştir. Antienfeksiyöz, antioksidan, antienflamatuar, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, trombosüpresif, antiartritik, kemopreventif ve antikanserojen özelliklerine dair birçok rapor bulunmaktadır. Kurkuminin ayrıca birden fazla hücrel moleküler hedefi (Şekil 2.13) modüle ettiği gösterilmiştir (Shanmugam vd., 2015; Chan vd., 2005; Sreejayan, 1997; Brouet ve Ohshima, 1995; Dikshit vd., 1995; Kiso vd., 1983; Venkatesan, 1998; Deodhar vd., 1980; Chen A vd., 2006; Chen J vd., 2006; Divya ve Pillai, 2006; Shishodia vd., 2007; Shanmugam vd., 2011).



Şekil 2.13. Kurkumin tarafından modüle edilen hücrel moleküler hedefler (Shanmugam vd., 2015)

Kurkumin, kanser başlangıcı ve ilerlemesinde aktif olarak yer alan çok sayıda hücre dışı ve hücre içi moleküllerle etkileşime girerek (Şekil 2.13) kanserin ilerlemesini engellediği açıklanmıştır (Shanmugam vd., 2015; Anand vd., 2008; Aggarwal ve Gehlot, 2009; Aggarwal vd., 2006; Gupta vd., 2011).

Kurkumin'in antikanser aktivitesi, transkripsiyon faktörler, sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türleri (ROS), COX-2, NF-κB, tümör nekroz faktörleri (TNF), matriks metaloproteinazlar (MMP'ler), sinyal iletili ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) ve protein kinaz B'nin etkili olduğu kanser hücre gelişimi, proliferasyon, transformasyon, invazyon, metastaz ve anjiogenez gibi çeşitli hücrel mekanizmalarla ilişkilidir (Wei vd., 2018).

Etki türlerine göre kemopreventif ajanlar farklı alt gruplara ayrılır: antiproliferatifler, antioksidanlar veya kanserojen bloke edici ajanlar. Kurkumin çoklu etki mekanizmaları nedeniyle bu 3 alt grubun hepsine dahildir. Kurkuminin antikanser etkileri esas olarak programlanmış hücre ölümü ve sağkalım sinyallerinin düzenlenmesinde yer alan çok sayıda biyokimyasal mekanizmadan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.13). Sinyal yollarında yer alan kurkumin hedeflerinde transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, enflamatuvar sitokinler, reseptörler ve enzimler bulunmaktadır (Shanmugam vd., 2015; Park vd., 2013).

### **3. GEREÇLER**

#### **3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Araçlar ve Gereçler**

Caco-2 Hücre Hattı (ATCC® HTB-37™, Amerika Birleşik Devletleri)

A549 Hücre Hattı (ATCC® CCL 185™, Amerika Birleşik Devletleri)

NIH/3T3 Hücre Hattı (ATCC® CRL-1658, Amerika Birleşik Devletleri)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Penisilin/Streptomisin (Gibco, Amerika Birleşik Devletleri)

12 kanallı otomatik pipet (Axygen, Birleşik Krallık)

Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya)

Tripan mavisi (Roche, Almanya)

Fluo-3 Suitable For Fluorescence %70 (Sigma-Aldrich, Almanya)

Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen, Almanya)

Cell Proliferation Kitt 8I (MTT) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma–Aldrich, Almanya)

10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipetör (Eppendorf, Kanada)

10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu (Greiner Bio-One, Amerika Birleşik Devletleri)

12 kanallı otomatik pipet (Axygen, Birleşik Krallık)

15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)

25 cm<sup>2</sup>-75 cm<sup>2</sup>lik hücre kültür flaskı (Greiner Bio-One, Amerika Birleşik Devletleri)

2 ml'lik Eppendorf tüp (Greiner Bio-One, Amerika Birleşik Devletleri)

6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre)

Cedex Smart Slide (Roche, Almanya)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Lamel (Isolab, Almanya)

Rimcazole dihydrochloride (Tocris Bioscience, Birleşik Krallık)

Kurkumin (Katolog no: C1386) (Sigma-Aldrich, Almanya)

*p*-Kumarik asit (Katolog no: C9008) (Sigma-Aldrich, Almanya)

*o*- Kumarik asit (Katolog no: PHL82343) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Trypsin-EDTA 10X (Pan Biotech, Almanya)

Masaüstü soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

Su banyosu (Nüve, Türkiye)

Vorteks (Daihan, Güney Kore)

Inverted mikroskop (Leica, Almanya)

Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Amerika Birleşik Devletleri)

Cedex XS (Innovatis, Amerika Birleşik Devletleri)

Derin dondurucu buzdolabı (Altus, Türkiye)

Hassas terazi (Ohaus, Avustralya)

Laminar flow kabin (Heal Force, Çin)

Light Cycler (Roche, Almanya)

## 4. YÖNTEM

### 4.1. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

#### 4.1.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmalarımızda kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılmış ve sterilizatörde kuru ısı ile 180 °C’de 2 saat; sıvı solüsyonlar ise otoklavda 121 °C, 1.5 atm/Hg’de 20 dakika olmak üzere steril edilmiştir.

#### 4.1.2. Rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin konsantrasyonlarının hazırlanması

Toz halindeki moleküler ağırlıkları bilinen rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin belirli hacimlerde DMSO içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonlarda ana stokları hazırlanmıştır. Belirli sayıda aliquotlama yapılarak, 20 °C’de stoklanmıştır. Deneyler sırasında taze medyum içinde dilue edilerek, farklı konsantrasyonlar hazırlanarak kullanılmıştır. Kontrol grubuna medyum içinde, %0.1 oranında DMSO (çözücü) eklenerek uygulanmıştır.

### 4.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çok hücreli organizmaların hücrelerinin ısı, nem, besin gibi şartların kontrol edilerek laboratuvar koşullarında ve özel kaplarda (Şekil 4.1) kontaminasyondan uzak tutularak yaşatılmasıdır. Kanser, aşı çalışmaları, ilaç geliştirilmesi ve *in vitro* sitotoksite çalışmaları sık tercih edilmektedir (Tokur ve Aksoy, 2017).



Şekil 4.1. Hücre kültür kapları (<http-11>)

Çalışmada kullanılan Caco-2, A549 ve 3T3 hücreleri daha önceden ATCC'den temin edilmiş olan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarının hücre kültürü stoklarından kullanılmıştır.

A549 (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı, ATCC kodu: CCL 185™) ve Caco-2 (insan kolorektal kanser hücre hattı, ATCC kodu: HTB-37™) hücreleri %10 fetal sıgır serumu, %1 penisillin-streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, NIH/3T3 (fare embriyonik fibroblast normal hücre hattı, ATCC CRL-1658) hücreleri de %10'luk fetal sıgır serumu ve %1 penisillin-streptomisin içeren DMEM (%1 L-glutamin, %1 sodyum pirüvat içeren) besiyerinde %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde, %95 bağıl nemde 37 °C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. Kültür flaskı %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman alt kültürlerle ayrılarak büyümesi sağlanmış ve deneylerde kullanılmıştır.

#### **4.2.1. Hücre sayımları**

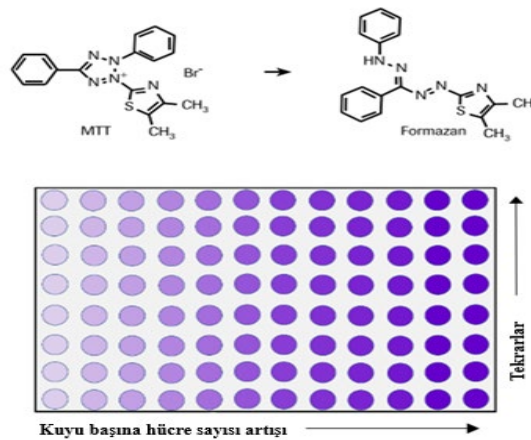
Çalışmalar süresince flasklar içerisindeki besiyerleri 2-3 gün arayla değiştirilerek, flask yüzeyinin tamamına yakın bölümü hücreler ile kaplanınca, hücreler tripsinojen yöntemiyle pasajlama işlemine tabi tutulmuştur. Öncelikle yapışan hücreler için üzerindeki besiyeri pipet yardımıyla çekilerek atılmıştır. Hücreler 5 ml PBS ile yıkanmıştır. Yapışan hücreler üzerine ve tüm yüzeye temas edecek şekilde 2 ml Trypsin (75 cm<sup>2</sup> için) ilavesinin ardından 3-5 dakika etüvde bekletilmiştir. Hücrelerin tamamen kalkması için hafif vurarak mekanik güç uygulanmıştır. Üzerine direkt 5-7 ml besiyeri eklenmiş ve pipet yardımıyla falkon tüpe alınan hücreler 5 dakika/1200 rpm santrifüj edilmiştir. Falkonda biriken sıvı kısım, santrifüjdeki yatay duruş yönünün tam tersinden olmak üzere dökülmüştür. Falkon içerisinde sadece hücrelerin kalması sağlanmıştır. Hücreler üzerine 1 ml besiyeri eklenmiştir ve pipet yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Bir lamel üzerine 10 µl Tripan Blue ve 10 µl hazırlanan hücrelerden ilave edilerek pipetaj işlemine tabi tutulmuştur. Hazırlanan karışımdan 10 µl alınan örnek tek kullanımlık Cedex Smart Slidelar'da (Şekil 4.2-A) bulunan kuyucuklara eklenerek Cedex XS otomatik hücre sayıcı cihaz (Şekil 4.2-B) içerisine yerleştirilmiştir. Böylece 1 ml içerisindeki hücre sayısı belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Cedex smart slide (A) ve Cedex XS otomatik hücre sayıcı (B) (<http-12>)

#### 4.2.2. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Heterosiklik organik yapıdaki tetrazolyum tuzlarından olan MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolyum bromür) bu yöntemde, elektron alarak formazan isimli yapıya indirgenmektedir. MTT bileşiği sarı renklidir, oluşan formazan ise mor renklidir. İndirgenme neticesinde oluşan renk kalorimetrik olarak ölçülmektedir. Formazan, suda çözünmeyip kristal şeklinde çöktüğü için testlerde çözündürmek için DMSO kullanımının uygun olduğu ortaya konulmuştur. Tetrazolyum halkası sadece aktif mitokondri tarafından kırılabilirdiğinden, renk reaksiyonu sadece canlı hücreler tarafından gerçekleştirilebilmektedir. Bu sebeple oluşan formazan miktarı, canlı hücre sayısını vermektedir (Tokur ve Aksoy, 2017; Karakaş vd., 2017) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Canlı hücreler tarafından 96 kuyulu bir plakada MTT'nin formazan tuzuna kimyasal reaksiyonla metabolize olması (<http-13>)

3T3, A549 ve Caco-2 hücreleri büyüme besiyeri ortamında 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının değerlendirilmesinde, sayım yapılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5×10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde besiyeri ortamına ekilmiştir. Hücrelerin plakaya yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin DMSO’da çözülerek hazırlanmış olan 100 µM stok solüsyonlarından; 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM ve 3.125 µM olacak şekilde dilüsyonlar yapılmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar, hücrelere tekli ve kombinasyonlar halinde uygulanmış ve tekrar hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak da besiyeri içinde %0.1’lük DMSO (çözücü) kullanılmıştır.

İnkübasyon süresinin sonunda plakanın içindeki besiyeri atılmış ve kuyucukta bulunan hücrelere 1/10 oranında MTT (5 mg/ml) solüsyonundan 100 µl olarak her kuyucuğa ilave edilerek plakalar 3 saat inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT içeren besiyerleri atılarak her kuyucuğa 100 µl DMSO konulmuştur. Plakalar, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader’da 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri, her grup için 8 tekrar (8 kuyucuk) olacak şekilde okunmuştur. Kontrol kuyularının absorbans değerleri ortalaması %100 kabul edilmiş ve maddelerin konsantrasyonları uygulanan grupların, % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100 \quad (4.1)$$

#### 4.2.3. Kombine konsantrasyonların sinerjistik sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

##### 4.2.3.1 İlaç etkileşim katsayısı (CDI) hesaplama

CDI, ilaç kombinasyonlarının etkilerini analiz etmek için kullanılır. CDI, şu şekilde hesaplanmaktadır:

$$CDI = AB/(A \times B) \quad (4.2)$$

Her grubun absorbansına göre, AB kombinasyon gruplarının kontrol grubuna oranı, A veya B tek ajan grubunun kontrol grubuna oranıdır. Dolayısıyla, CDI < 1, = 1 veya > 1 ilaçların sırasıyla sinerjistik, additif veya antagonist etkilerini gösterir (Zhao vd., 2014; Hao vd., 2008).

Bununla birlikte CDI ile ilaç etkileşimini, sadece bir konsantrasyonda değerlendirmek kapsamlı değildir. Klasik CDI yöntemi değiştirilerek ilaç ajanlarının toplam ilaç etkileşimini değerlendirebilmek için birkaç ilaç konsantrasyonunun ortalama CDI değeri hesaplanmıştır (Zhao vd., 2014).

Hesaplanan sonuçlarda çıkan ilaç etkileşim katsayıları; **CDI < 1 sinerjistik etki, CDI < 0.7 kuvvetli sinerjistik etki, CDI = 1 additif etki** ve **CDI > 1 ise antagonist etki** olarak değerlendirilmiştir (Zhao vd., 2014; Hao vd., 2008; Lopez-Acevedo vd., 2014).

#### 4.2.4. İstatistik

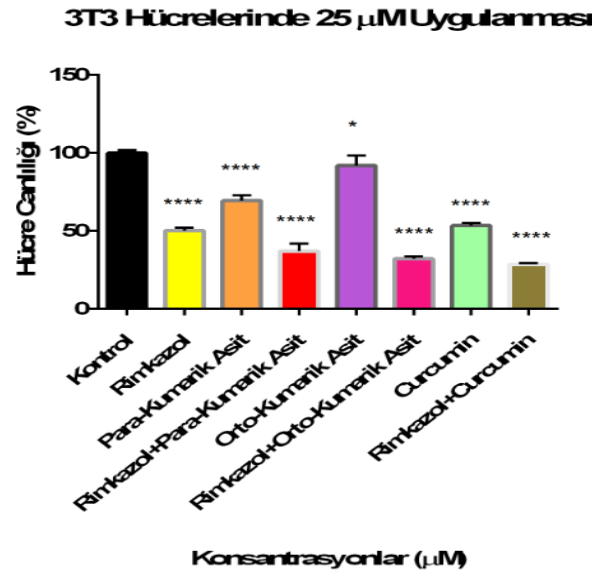
MTT analizi sonucu elde edilen % hücre canlılıklarına göre hazırlanan grafikler ve CDI tabloları Graphpad Prism 8’de tek yönlü varyans analizi ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. Anlamlılık değerleri;  $p > 0.05$  fark yok,  $*p < 0.05$  fark var,  $**p < 0.01$  önemli derecede fark var,  $***p < 0.001$  çok önemli derecede fark var,  $****p < 0.0001$  çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Rimkazol, *p*-Kumarik asit, *o*-Kumarik asit ve Kurkuminin Tekli ve Rimkazol ile Kombinasyonlarının 3T3 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

3T3 hücrelerinde rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin 25, 12.5  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M ve 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlarının tekli uygulamaları ve rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin kombin uygulamalarının % hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 5.1-Şekil 5.4' te verilmiştir.

Şekil 5.1'de görüldüğü gibi kontrole göre 25  $\mu$ M rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin uygulanan gruplarda MTT sonuçlarımıza paralel olarak hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombin konsantrasyonların (25  $\mu$ M + 25  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak 3T3 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.

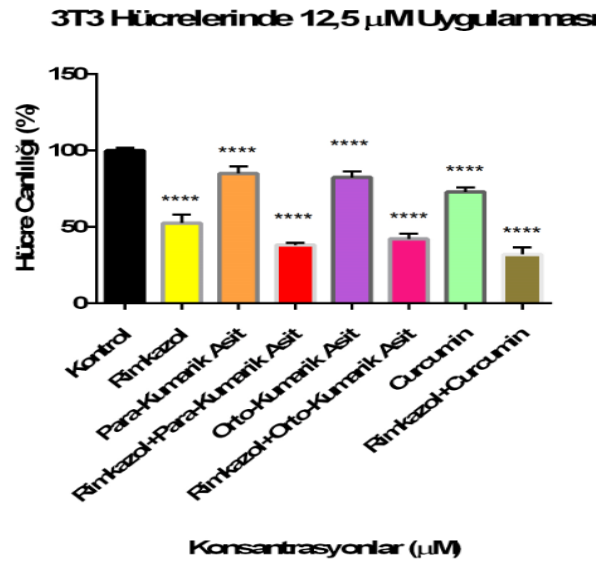


Şekil 5.1. 3T3 hücrelerinde 25  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin tekli ve rimkazol ile kombin uygulamalarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.05$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, 3T3 hücrelerinde sadece 25  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %50.17, %69.44, %91.99, %53.41 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik

asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (25  $\mu$ M + 25  $\mu$ M) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %37.07, %32.17 ve %28.61 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre, 25  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombin gruplar arasından istatistiksel anlamlılık *o*-kumarik asit için  $*p < 0.05$ ; diğer tüm gruplarda ise  $****p < 0.0001$  olarak bulunmuştur (Şekil 5.1).

Şekil 5.2’de görüldüğü gibi kontrole göre 12.5  $\mu$ M rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin uygulanan gruplarda MTT sonuçlarımıza paralel olarak hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombin konsantrasyonların (12.5  $\mu$ M + 12.5  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak 3T3 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.

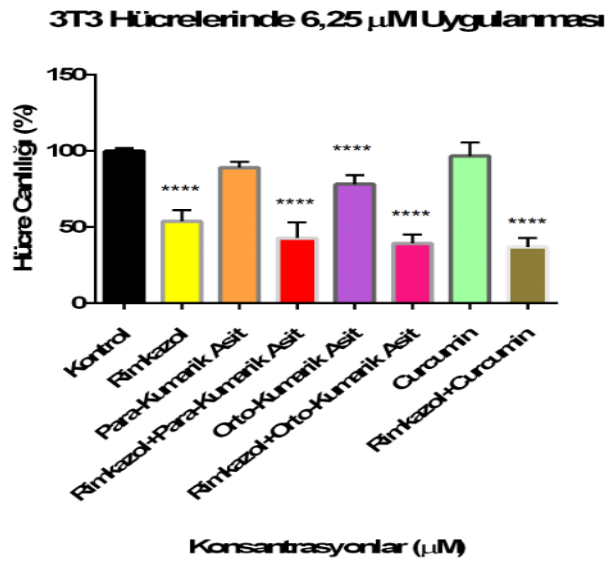


**Şekil 5.2.** 3T3 hücrelerinde 12,5  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8’de bulunan  $P$  değerleri;  $****p < 0.0001$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, 3T3 hücrelerinde sadece 12.5  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %52.62, %85.05, %82.41, %72.89 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (12.5  $\mu$ M + 12.5  $\mu$ M) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %38.20, %42,18 ve %32.11 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre, 12.5  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve

kombin gruplar arasından istatistiksel anlamlılık tüm gruplarda \*\*\*\* $p < 0.0001$  olarak bulunmuştur (Şekil 5.2).

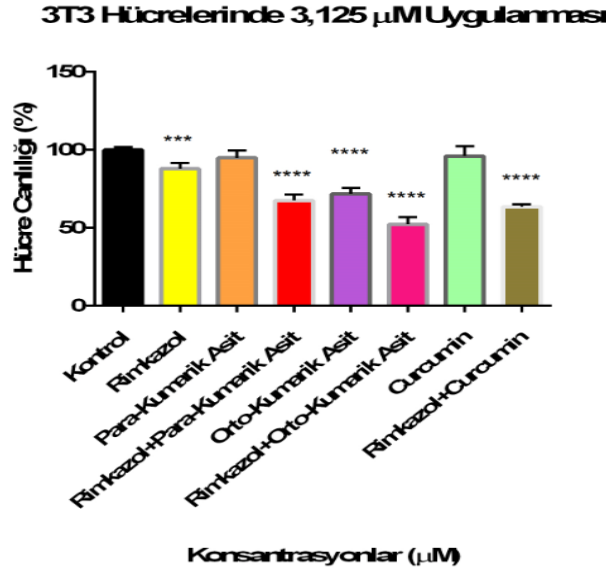
Şekil 5.3'te görüldüğü gibi kontrole göre 6.25  $\mu\text{M}$  *p*-kumarik asit ve kurkumin hariç rimkazol ve *o*-kumarik asit uygulanan gruplarda MTT sonuçlarımıza paralel olarak hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombin konsantrasyonların (6.25  $\mu\text{M}$  + 6.25  $\mu\text{M}$ ) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak 3T3 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.



**Şekil 5.3.** 3T3 hücrelerinde 6.25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8'de bulunan  $P$  değerleri; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır(Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, 3T3 hücrelerinde sadece 6.25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %53.84, %89.07, %78.21, %96.71 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (6.25  $\mu\text{M}$  + 6.25  $\mu\text{M}$ ) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %42.76, %39.37 ve %36.88 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre, 6.25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombin gruplar arasından istatistiksel anlamlılık rimkazol, rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombinasyonu, *o*-kumarik asit, rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyonu ve rimkazolün kurkumin ile kombinasyon grupları için \*\*\*\* $p < 0.0001$  olarak bulunmuştur (Şekil 5.3).

Şekil 5.4'te görüldüğü gibi kontrole göre 3.125  $\mu$ M *p*-kumarik asit ve kurkumin hariç rimkazol ve *o*-kumarik asit uygulanan gruplarda MTT sonuçlarımıza paralel olarak hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombin konsantrasyonların (3.125  $\mu$ M + 3.125  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak 3T3 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.



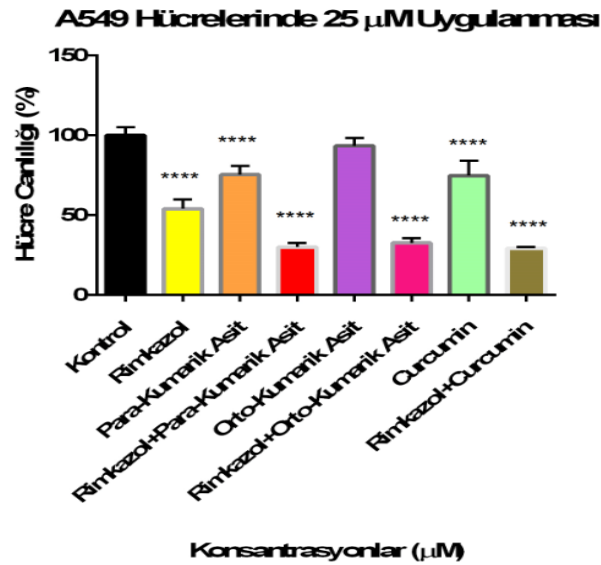
**Şekil 5.4.** 3T3 hücrelerinde 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8'de bulunan  $P$  değerleri; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, 3T3 hücrelerinde sadece 3.125  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %87.94, %94.94, %71.85 ve %96.02 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (3.125  $\mu$ M + 3.125  $\mu$ M) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %67.59, %52.30 ve %63.53 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 3.125  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombin gruplar arasından istatistiksel anlamlılık rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombinasyonu, *o*-kumarik asit, rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyonu ve rimkazolün kurkumin ile kombinasyon grupları için  $p < 0.0001$ ; rimkazol için  $p < 0.001$  olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.4).

## 5.2. Rimkazol, *p*-Kumarik asit, *o*-Kumarik asit ve Kurkuminin Tekli ve Rimkazol ile Kombinasyonlarının A549 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

A549 akciğer kanseri hücrelerinde rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin 25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M ve 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlarının tekli uygulamaları ve rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin kombin uygulamalarının % hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 5.5- Şekil 5.8’de verilmiştir.

Şekil 5.5’te görüldüğü gibi kontrole göre 25  $\mu$ M *o*-kumarik asit hariç rimkazol, *p*-kumarik asit, ve kurkumin uygulanan gruplarda MTT sonuçlarımıza paralel olarak hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombin konsantrasyonların (25  $\mu$ M + 25  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak A549 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.

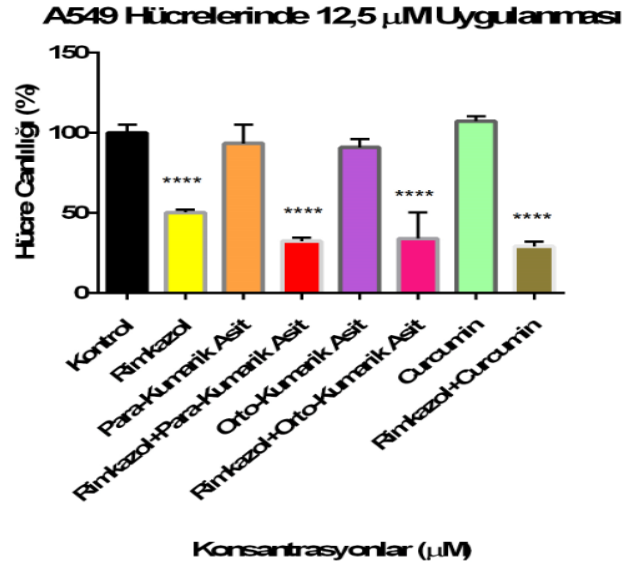


**Şekil 5.5.** A549 hücrelerinde 25  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8’de bulunan  $P$  değerleri; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, A549 hücrelerinde sadece 25  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %54.12, %75.39, %93.45 ve %74.81 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (25  $\mu$ M + 25  $\mu$ M) gruplarda

da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %30.11, %32.71 ve %29.37 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 25  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombin gruplar arasından istatistiksel anlamlılık rimkazol, *p*-kumarik asit, rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombinasyonu, rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyonu, kurkumin ve rimkazolün kurkumin ile kombinasyon grupları için  $p < 0.0001$  olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.5).

Şekil 5.6’da görüldüğü gibi kontrole göre 12.5  $\mu$ M rimkazol hariç *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin tekli uygulandığı gruplarda hücrelerin canlılığı kontrole göre anlamlı derecede azalmamıştır. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombin konsantrasyonların (12.5  $\mu$ M + 12.5  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak A549 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.

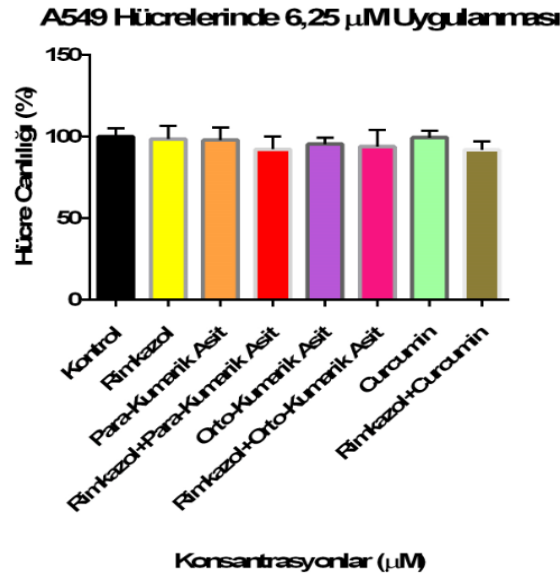


**Şekil 5.6.** A549 hücrelerinde 12.5  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8’de bulunan  $P$  değerleri; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, A549 hücrelerinde sadece 12.5  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %50.33, %93.47, %90.99 ve %107.3 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (12.5  $\mu$ M + 12.5  $\mu$ M) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %32.41, %34.10 ve %29.17 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 12.5  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombin

gruplar arasından istatistiksel anlamlılık rimkazol, rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombinasyonu, rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyonu ve rimkazolün kurkumin ile kombinasyon grupları için  $p < 0.0001$  olarak anlamlı bulunmuştur. (Şekil 5.6).

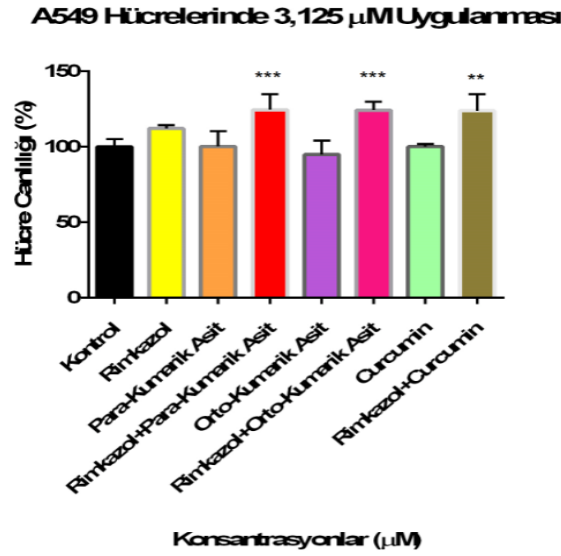
Şekil 5.7’de görüldüğü gibi kontrole göre 6.25  $\mu$ M rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin uygulanan gruplarda hücrelerin canlılığının anlamlı azalmadığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombinasyonlarının (6.25  $\mu$ M + 6.25  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da önemli bir sitotoksik sitotoksik etki belirlenmemiştir.



**Şekil 5.7.** A549 hücrelerinde 6.25  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8’de bulunan *P* değerleri; ns anlamsız) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, A549 hücrelerinde sadece 6.25  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %98.54, %97.98, %95.44 ve %99.43 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombinasyonlarının uygulanan (6.25  $\mu$ M + 6.25  $\mu$ M) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %92.26, %93.99 ve %91.93 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 6.25  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombinasyon grupları arasından istatistiksel anlamlılık tüm gruplar için anlamsız bulunmuştur (Şekil 5.7).

Şekil 5.8’de görüldüğü gibi kontrole göre 3.125  $\mu$ M rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin uygulanan gruplarda hücrelerin canlılığının anlamlı azalmadığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombinasyonlarının (3.125  $\mu$ M + 3.125  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etki belirlenmemiş olup, özellikle kombine uygulama gruplarında hücre proliferasyonu artmıştır.



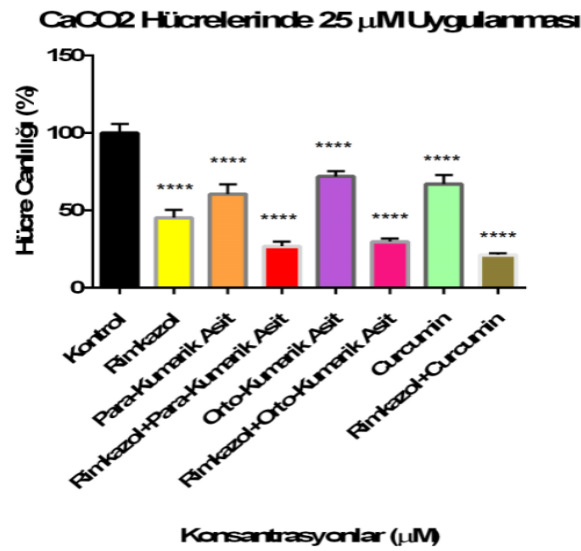
**Şekil 5.8.** A549 hücrelerinde 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8’de bulunan *P* değerleri; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, A549 hücrelerinde sadece 3.125  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %112.2, %100.3, %94.98 ve %100.1 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombinasyonlarının uygulanan (3.125  $\mu$ M + 3.125  $\mu$ M) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %124.6, %124.4 ve %123.98 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 3.125  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombinasyon grupları arasında hücre proliferasyonlarının artışına bağlı olarak istatistiksel anlamlılık rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombinasyon ve rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyon grupları için  $p < 0.001$ ; rimkazolün kurkumin ile kombinasyonu için  $p < 0.01$  olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.8).

### 5.3. Rimkazol, *p*-Kumarik asit, *o*-Kumarik asit ve Kurkuminin tekli ve Rimkazol ile Kombinasyonlarının Caco-2 Hücrelerinde 24. saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin 25, 12.5  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M ve 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlarının tekli uygulamaları ve rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin kombin uygulamalarının % hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 5.9- Şekil 5.12’de verilmiştir.

Şekil 5.9’da görüldüğü gibi kontrole göre 25  $\mu$ M rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin uygulanan gruplarda MTT sonuçlarımıza paralel olarak hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombin konsantrasyonların (25  $\mu$ M + 25  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak Caco-2 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.

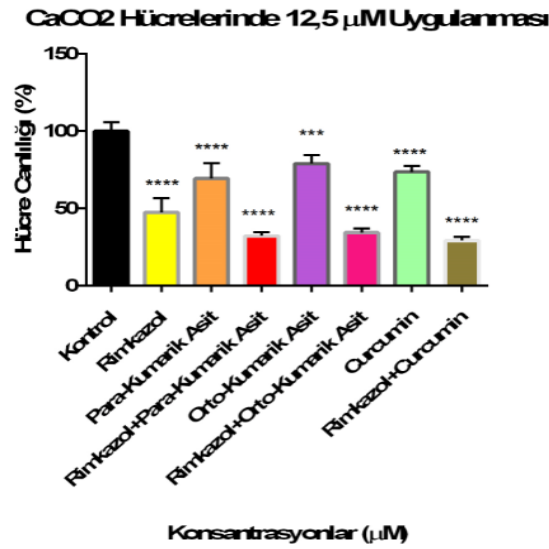


**Şekil 5.9.** Caco-2 hücrelerinde 25  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8’de bulunan  $P$  değerleri; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, Caco-2 hücrelerinde sadece 25  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %45.28, %60.62, %71.95 ve %67.05 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (25  $\mu$ M + 25  $\mu$ M) gruplarda

da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %26.87, %29.83 ve %21.29 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 25  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombin gruplar arasından istatistiksel anlamlılık tüm gruplar için  $p < 0.0001$  olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.9).

Şekil 5.10'da görüldüğü gibi kontrole göre 12.5  $\mu$ M rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin uygulanan gruplarda MTT sonuçlarımıza paralel olarak hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombin konsantrasyonların (12.5  $\mu$ M + 12.5  $\mu$ M) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak Caco-2 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.

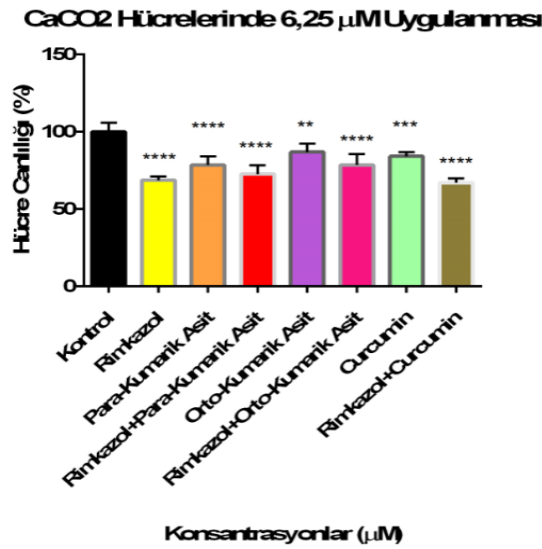


**Şekil 5.10.** Caco-2 hücrelerinde 12.5  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8'de bulunan  $P$  değerleri; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, Caco-2 hücrelerinde sadece 12.5  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %47.44, %69.49, %79.04 ve %73.66 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (12.5  $\mu$ M + 12.5  $\mu$ M) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %32.30, %34.43 ve %29.29 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 12.5  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombin gruplar arasından istatistiksel anlamlılık rimkazol, *p*-kumarik asit, rimkazolün *p*-

kumarik asit ile kombinasyonu, rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyonu, kurkumin, rimkazolün kurkumin ile kombinasyon grupları için  $p < 0.0001$ ; *o*-kumarik asit için  $p < 0.001$  olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.10).

Şekil 5.11’de görüldüğü gibi kontrole göre 6.25  $\mu\text{M}$  rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin uygulanan gruplarda MTT sonuçlarımıza paralel olarak hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin kombinasyonlarının (6.25  $\mu\text{M}$  + 6.25  $\mu\text{M}$ ) uygulandığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak Caco-2 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.

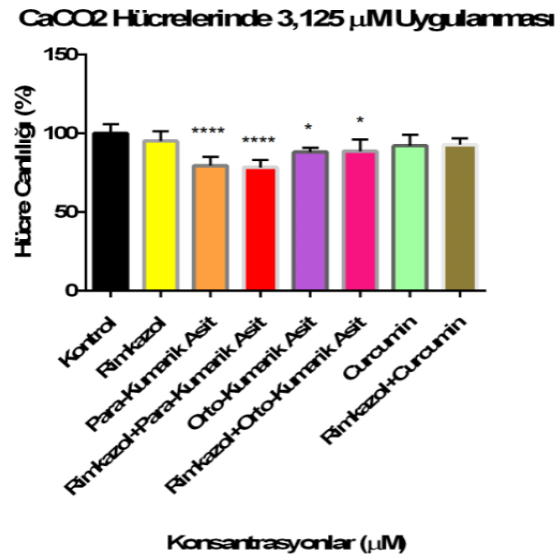


**Şekil 5.11.** Caco-2 hücrelerinde 6.25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8’de bulunan  $P$  değerleri; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, Caco-2 hücrelerinde sadece 6.25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %68.69, %78.59, %86.92 ve %84.15 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombinasyonlarının uygulanan (6.25  $\mu\text{M}$  + 6.25  $\mu\text{M}$ ) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %72.71, %84.15 ve %67.08 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 6.25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombinasyon grupları arasında istatistiksel anlamlılık rimkazol, *p*-kumarik asit, rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombinasyonu, rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyonu, rimkazolün

kurkumin ile kombinasyon grupları için  $p < 0.0001$ ; kurkumin için  $p < 0.001$ ; *o*-kumarik asit için  $p < 0.01$  olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.11).

Şekil 5.12’de görüldüğü gibi kontrole göre 3.125  $\mu$ M *p*- ve *o*-kumarik uygulanan gruplarda hücrelerin canlılığının azaldığı görülmektedir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit ve rimkazol ile *o*-kumarik asit kombin konsantrasyonların (3.125  $\mu$ M + 3.125  $\mu$ M) uyguladığı gruplarda da sitotoksik etkiye bağlı olarak Caco-2 hücrelerinin canlılıkları azalmıştır.



**Şekil 5.12.** Caco-2 hücrelerinde 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlardaki rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma,  $n = 8$ , GraphPad Prism 8’de bulunan  $P$  değerleri; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.05$ ) Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarımıza göre, Caco-2 hücrelerinde sadece 3.125  $\mu$ M konsantrasyonda rimkazol, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %95.15, %79.57, %88.14 ve %92.24 olarak belirlenmiştir. Rimkazol ile *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkuminin kombin uygulanan (3.125  $\mu$ M + 3.125  $\mu$ M) gruplarda da sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %78.50, %88.70 ve %92.87 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 3.125  $\mu$ M konsantrasyonların uygulandığı tekli ve kombin gruplar arasından istatistiksel anlamlılık *p*-kumarik asit ve rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombinasyonu için  $p < 0.0001$ ; *o*-kumarik asit ve rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyonu için  $p < 0.05$  olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.12).

#### 5.4. Rimkazolün *p*-Kumarik asit, *o*-Kumarik asit ve Kurkumin ile Kombinasyonlarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 3T3, A549 ve Caco-2 Hücreleri Üzerinde Sinerjistik Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombine uygulamalarının 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM ve 3.125 µM konsantrasyonlarda 3T3, A549 ve Caco-2 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri aşağıdaki CDI formülüne göre, MTT absorbans sonuçlarının % hücre canlılık değerlerine dönüştürülmesiyle hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Buna göre;

$$CDI = \frac{\text{Kombin (A + B) \% Hücre Canlılığı}}{\text{A \% Hücre Canlılığı} \times \text{B \% Hücre Canlılığı}} \times 100 \quad (5.1)$$

formülü ile yapılan hesaplamada, kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. Hesaplanan sonuçlarda çıkan ilaç etkileşim katsayıları;  $CDI < 1$  sinerjistik etki,  $CDI < 0.7$  kuvvetli sinerjistik etki,  $CDI = 1$  additif etki ve  $CDI > 1$  ise antagonist etki olarak değerlendirilmiştir (Zhao vd., 2014; Hao vd., 2008; Lopez-Acevedo vd., 2014).

##### 5.4.1. Rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombin konsantrasyonlarının 3T3 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre 3T3 hücrelerinde rimkazol ve *p*-kumarik asit kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25 µM rimkazol ve *p*-kumarik asit için  $CDI = 1$  (additif etki); 12.5 µM, 6.25 µM ve 3.125 µM rimkazol ve *p*-kumarik asit için de  $CDI < 1$  (sinerjistik etki) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.1).

**Tablo 5.1.** 3T3 hücrelerinde rimkazol, *p*-kumarik asit ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama ± Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

| Konsantrasyon (µM) | Rimkazol      | <i>p</i> -Kumarik asit | Rimkazol + <i>p</i> -Kumarik asit | CDI      |
|--------------------|---------------|------------------------|-----------------------------------|----------|
| 25 µM              | 50.17 ± 1.926 | 69.44 ± 3.516          | 37.07 ± 4.762                     | 1.064145 |
| 12.5 µM            | 52.62 ± 5.485 | 85.05 ± 4.604          | 38.20 ± 1.462                     | 0.853569 |
| 6.25 µM            | 53.84 ± 7.176 | 89.07 ± 3.732          | 42.76 ± 10.38                     | 0.891714 |
| 3.125 µM           | 87.94 ± 3.664 | 94.94 ± 4.572          | 67.59 ± 3.712                     | 0.809624 |

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre 3T3 hücrelerinde rimkazol ve *o*-kumarik asit kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M ve 3.125  $\mu$ M rimkazol ve *o*-kumarik asit için CDI < 1 (sinerjist etki); ayrıca 25  $\mu$ M rimkazol ve *o*-kumarik asit için CDI < 0.7 (kuvvetli sinerjist etki) hesaplanmıştır (Tablo 5.2).

**Tablo 5.2.** 3T3 hücrelerinde rimkazol, *o*-kumarik asit ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125  $\mu$ M) 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

| Konsantrasyon<br>( $\mu$ M) | Rimkazol          | <i>o</i> -Kumarik asit | Rimkazol + <i>o</i> -Kumarik asit | CDI      |
|-----------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------------|----------|
| 25 $\mu$ M                  | 50.17 $\pm$ 1.926 | 91.99 $\pm$ 6.326      | 32.17 $\pm$ 1.429                 | 0.697168 |
| 12.5 $\mu$ M                | 52.62 $\pm$ 5.485 | 82.41 $\pm$ 4.030      | 42.18 $\pm$ 3.452                 | 0.972729 |
| 6.25 $\mu$ M                | 53.84 $\pm$ 7.176 | 78.21 $\pm$ 5.880      | 39.37 $\pm$ 5.668                 | 0.935022 |
| 3.125 $\mu$ M               | 87.94 $\pm$ 3.664 | 71.85 $\pm$ 3.789      | 52.30 $\pm$ 4.602                 | 0.827689 |

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre 3T3 hücrelerinde rimkazol ve kurkumin kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25  $\mu$ M rimkazol ve kurkumin için CDI = 1 (additif etki); 12.5  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M ve 3.125  $\mu$ M rimkazol ve kurkumin için de CDI < 1 (sinerjist etki) hesaplanmıştır (Tablo 5.3).

**Tablo 5.3.** 3T3 hücrelerinde rimkazol, kurkumin ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125  $\mu$ M) 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

| Konsantrasyon<br>( $\mu$ M) | Rimkazol          | Kurkumin          | Rimkazol + Kurkumin | CDI      |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|----------|
| 25 $\mu$ M                  | 50.17 $\pm$ 1.926 | 53.41 $\pm$ 1.667 | 28.61 $\pm$ 0.8106  | 1.067796 |
| 12.5 $\mu$ M                | 52.62 $\pm$ 5.485 | 72.89 $\pm$ 2.998 | 32.11 $\pm$ 4.445   | 0.83729  |
| 6.25 $\mu$ M                | 53.84 $\pm$ 7.176 | 96.71 $\pm$ 8.919 | 36.88 $\pm$ 5.875   | 0.70838  |
| 3.125 $\mu$ M               | 87.94 $\pm$ 3.664 | 96.02 $\pm$ 6.339 | 63.53 $\pm$ 1.626   | 0.752437 |

#### 5.4.2. Rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombin konsantrasyonlarının A549 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjist etkileşimleri

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre A549 hücrelerinde rimkazol ve *p*-kumarik asit kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M ve 6.25  $\mu$ M rimkazol ve *p*-kumarik asit için CDI < 1 (sinerjist etki); 3.125  $\mu$ M rimkazol ve *p*-kumarik asit için CDI > 1 (antagonist etki); ayrıca 12.5  $\mu$ M rimkazol ve *p*-kumarik asit için de CDI < 0.7 (kuvvetli sinerjist etki) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.4).

**Tablo 5.4.** A549 hücrelerinde rimkazol, *p*-kumarik asit ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125  $\mu$ M) 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

| Konsantrasyon ( $\mu$ M) | Rimkazol          | <i>p</i> -Kumarik asit | Rimkazol + <i>p</i> -Kumarik asit | CDI      |
|--------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------------|----------|
| 25 $\mu$ M               | 54.12 $\pm$ 5.817 | 75.39 $\pm$ 5.429      | 30.11 $\pm$ 2.496                 | 0.737889 |
| 12.5 $\mu$ M             | 50.33 $\pm$ 1.813 | 93.47 $\pm$ 11.69      | 32.41 $\pm$ 2.202                 | 0.688944 |
| 6.25 $\mu$ M             | 98.54 $\pm$ 8.092 | 97.98 $\pm$ 7.665      | 92.26 $\pm$ 7.960                 | 0.955548 |
| 3.125 $\mu$ M            | 112.2 $\pm$ 2.278 | 100.3 $\pm$ 10.09      | 124.6 $\pm$ 10.28                 | 1.106672 |

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre A549 hücrelerinde rimkazol ve *o*-kumarik asit kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M ve 6.25  $\mu$ M rimkazol ve *o*-kumarik asit için CDI < 1 (sinerjist etki); 3.125  $\mu$ M rimkazol ve *o*-kumarik asit için CDI > 1 (antagonist etki); ayrıca 25  $\mu$ M rimkazol ve *o*-kumarik asit için de CDI < 0.7 (kuvvetli sinerjist etki) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.5).

**Tablo 5.5.** A549 hücrelerinde rimkazol, *o*-kumarik asit ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125  $\mu$ M) 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

| Konsantrasyon ( $\mu$ M) | Rimkazol          | <i>o</i> -Kumarik asit | Rimkazol + <i>o</i> -Kumarik asit | CDI      |
|--------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------------|----------|
| 25 $\mu$ M               | 54.12 $\pm$ 5.817 | 93.45 $\pm$ 4.987      | 32.71 $\pm$ 3.018                 | 0.646774 |
| 12.5 $\mu$ M             | 50.33 $\pm$ 1.813 | 90.99 $\pm$ 5.151      | 34.10 $\pm$ 16.37                 | 0.744639 |
| 6.25 $\mu$ M             | 98.54 $\pm$ 8.092 | 95.44 $\pm$ 3.868      | 93.99 $\pm$ 10.19                 | 0.999355 |
| 3.125 $\mu$ M            | 112.2 $\pm$ 2.278 | 94.98 $\pm$ 9.243      | 124.4 $\pm$ 5.453                 | 1.166956 |

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre A549 hücrelerinde rimkazol ve kurkumin kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M ve 6.25  $\mu$ M rimkazol ve kurkumin için CDI < 1 (sinerjist etki); 3.125  $\mu$ M rimkazol ve kurkumin için CDI > 1 (antagonist etki); ayrıca 12.5  $\mu$ M rimkazol ve kurkumin için de CDI < 0.7 (kuvvetli sinerjist etki) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.6).

**Tablo 5.6.** A549 hücrelerinde rimkazol, kurkumin ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125  $\mu$ M) 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

| Konsantrasyon ( $\mu$ M) | Rimkazol          | Kurkumin          | Rimkazol + Kurkumin | CDI      |
|--------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|----------|
| 25 $\mu$ M               | 54.12 $\pm$ 5.817 | 74.81 $\pm$ 9.347 | 29.37 $\pm$ 0.7748  | 0.725427 |
| 12.5 $\mu$ M             | 50.33 $\pm$ 1.813 | 107.3 $\pm$ 3.235 | 29.17 $\pm$ 2.913   | 0.540427 |
| 6.25 $\mu$ M             | 98.54 $\pm$ 8.092 | 99.43 $\pm$ 4.301 | 91.93 $\pm$ 5.116   | 0.938225 |
| 3.125 $\mu$ M            | 112.2 $\pm$ 2.278 | 100.1 $\pm$ 1.755 | 123.98 $\pm$ 10.91  | 1.103354 |

#### 5.4.3. Rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombin konsantrasyonlarının Caco-2 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjist etkileşimleri

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre Caco-2 hücrelerinde rimkazol ve *p*-kumarik asit kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25  $\mu$ M ve 12.5  $\mu$ M rimkazol ve *p*-kumarik asit için CDI < 1 (sinerjist etki); 6.25  $\mu$ M rimkazol ve *p*-kumarik asit için CDI > 1 (antagonist etki); 3.125  $\mu$ M rimkazol ve *p*-kumarik asit için de CDI = 1 (aditif etki) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.7).

**Tablo 5.7.** Caco-2 hücrelerinde rimkazol, *p*-kumarik asit ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125  $\mu$ M) 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama  $\pm$  Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

| Konsantrasyon ( $\mu$ M) | Rimkazol          | <i>p</i> -Kumarik asit | Rimkazol + <i>p</i> -Kumarik asit | CDI      |
|--------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------------|----------|
| 25 $\mu$ M               | 45.28 $\pm$ 5.008 | 60.62 $\pm$ 6.249      | 26.87 $\pm$ 3.067                 | 0.979032 |
| 12.5 $\mu$ M             | 47.44 $\pm$ 9.232 | 69.49 $\pm$ 9.822      | 32.30 $\pm$ 2.225                 | 0.979623 |
| 6.25 $\mu$ M             | 68.69 $\pm$ 2.330 | 78.59 $\pm$ 5.610      | 72.71 $\pm$ 5.733                 | 1.346972 |
| 3.125 $\mu$ M            | 95.15 $\pm$ 6.291 | 79.57 $\pm$ 5.469      | 78.50 $\pm$ 4.727                 | 1.036838 |

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre Caco-2 hücrelerinde rimkazol ve *o*-kumarik asit kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25  $\mu$ M ve 12.5  $\mu$ M rimkazol ve *o*-kumarik asit için CDI < 1 (sinerjist etki); 6.25  $\mu$ M rimkazol ve *o*-kumarik asit için CDI > 1 (antagonist etki); 3.125  $\mu$ M rimkazol ve *o*-kumarik asit için de CDI = 1 (aditif etki) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.8).

**Tablo 5.8.** *Caco-2 hücrelerinde rimkazol, o-kumarik asit ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama ± Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı*

| Konsantrasyon (µM) | Rimkazol      | o-Kumarik asit | Rimkazol + o-Kumarik asit | CDI      |
|--------------------|---------------|----------------|---------------------------|----------|
| 25 µM              | 45.28 ± 5.008 | 71.95 ± 3.474  | 29.83 ± 2.053             | 0.915646 |
| 12.5 µM            | 47.44 ± 9.232 | 79.04 ± 5.507  | 34.43 ± 2.692             | 0.918255 |
| 6.25 µM            | 68.69 ± 2.330 | 86.92 ± 5.457  | 78.59 ± 7.131             | 1.316379 |
| 3.125 µM           | 95.15 ± 6.291 | 88.14 ± 2.759  | 88.70 ± 7.356             | 1.057688 |

MTT sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre Caco-2 hücrelerinde rimkazol ve kurkumin kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte 25 µM ve 12.5 µM rimkazol ve kurkumin için CDI < 1 (sinerjist etki); 6.25 µM rimkazol ve kurkumin için CDI > 1 (antagonist etki); 3.125 µM rimkazol ve kurkumin için de CDI = 1 (additif etki) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.9).

**Tablo 5.9.** *Caco-2 hücrelerinde rimkazol, kurkumin ve kombine uygulamalarının (25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) 24 saat için % hücre canlılık oranları (Ortalama ± Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı*

| Konsantrasyon (µM) | Rimkazol      | Kurkumin      | Rimkazol + Kurkumin | CDI      |
|--------------------|---------------|---------------|---------------------|----------|
| 25 µM              | 45.28 ± 5.008 | 67.05 ± 5.884 | 21.29 ± 1.082       | 0.701132 |
| 12.5 µM            | 47.44 ± 9.232 | 73.66 ± 4.038 | 29.29 ± 2.356       | 0.838127 |
| 6.25 µM            | 68.69 ± 2.330 | 84.15 ± 2.639 | 67.08 ± 2.749       | 1.160459 |
| 3.125 µM           | 95.15 ± 6.291 | 92.24 ± 6.814 | 92.87 ± 4.081       | 1.058189 |

Bu tez çalışması ile rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının hücreler üzerinde sitotoksik etkileri araştırılarak, antikanser etkinlikleri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla A549 akciğer kanseri, Caco-2 kolon kanser hücreleri ile 3T3 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombinasyonlarının farklı konsantrasyonlarda sitotoksik etkileri MTT testi ile araştırılmış; sinerjist/antagonist etkinlikleri arasındaki ilişki de CDI değerleri hesaplanarak belirlenmiştir.

Rimkazol, glioma ve meme kanserine karşı güçlü tek ajan anti-tümör aktivitesi gösteren çeşitli kanserler için halen klinik çalışmalarda kullanılan bir sigma reseptörü ligandıdır (de Bruyn vd., 2010). Rybczynska ve diğerleri (2008) tarafından, rimkazol ile C6 sıçan glioma hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda antikanser etkisi belirlenmiştir (Rybczynska vd., 2008).

de Bruyn ve diğeri (2010) tarafından, rimkazolün anti-MCSP: TRAIL ile kombine uygulamalarda melanom hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri değerlendirilmiş, malign melanom tedavisi için potansiyel değerde olabileceği sonucuna varılmıştır (de Bruyn vd., 2010). Happy ve diğeri (2015) MCF-7, T47D, MDA-MB-231 ve MDA-MB-157 meme kanseri hücreleri üzerinde yaptığı çalışmalarda rimkazolün düşük dozlarda (4  $\mu$ M) hücre büyümesini önemli ölçüde etkilemediği fakat belirli bir eşik konsantrasyonun üzerinde (10  $\mu$ M) hücre sayısında azalma olduğu ve 40  $\mu$ M rimkazol ile 5 günlük muameleden sonra tüm hücre hatlarında tam hücre ölümü gerçekleştiği; ayrıca rimkazolün p53 ile kombine uygulamasında da önemli ölçüde hücre ölümünün arttığı belirlenmiştir (Happy vd., 2015). Bu tez çalışmasında sigma reseptör antagonistlerinden rimkazolün tekli ve *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin ile kombine uygulamalarının Caco-2 kolon kanseri, A549 akciğer kanseri ve 3T3 sağlıklı fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkileri değerlendirildiğinde; MTT sonuçlarına göre hücre canlılıklarının konsantrasyona bağlı sonuçlarında rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile ikili kombinasyonlarının 3T3 hücreleri üzerinde 25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M ve 6.25  $\mu$ M konsantrasyonlarda; A549 hücreleri ile Caco-2 hücreleri üzerinde 25  $\mu$ M ve 12.5  $\mu$ M konsantrasyonlarda hücre canlılıklarında belirgin azalma belirlenmiş olup rimkazolün antikanser ve sitotoksik etkileri literatürlerde yer alan çalışmaları destekler niteliktedir. Ayrıca rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile ikili kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerinde 3.125  $\mu$ M konsantrasyonda sitotoksik etki göstermediği, aksine hücre proliferasyonunda artış gerçekleştiği belirlenmiş olup, 3.125  $\mu$ M konsantrasyonda antikanser aktivite göstermediği değerlendirilmiştir.

3T3 hücreleri üzerinde hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombinasyonlarında 25  $\mu$ M konsantrasyonda additif etki (CDI = 1), 12.5  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M ve 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlarda sinerjistik etki (CDI < 1); rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombinasyonlarında 25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M ve 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlarda sinerjistik etki (CDI < 1), 25  $\mu$ M konsantrasyonda kuvvetli sinerjistik etki (CDI < 0.7); rimkazolün kurkumin ile kombinasyonlarında 25  $\mu$ M konsantrasyonda additif etki (CDI = 1), 12.5  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M ve 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlarda sinerjistik etki (CDI < 1) gösterdiği belirlenmiştir.

A549 hücreleri üzerinde hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile ikili kombinasyonlarında 25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M ve 6.25  $\mu$ M konsantrasyonlarda sinerjistik etki (CDI < 1), 3.125  $\mu$ M konsantrasyonlarda ise antagonist etki (CDI > 1) değerlendirilirken; rimkazol + *p*-kumarik asit ve rimkazol +

curcumin kombinasyonlarının 12.5 µM konsantrasyonda, rimkazol + *o*-kumarik asit kombinasyonunun 25 µM konsantrasyonda kuvvetli sinerjistik etki ( $CDI < 0.7$ ) gösterdiği belirlenmiştir.

Caco-2 hücreleri üzerinde hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre rimkazol + *p*-kumarik asit, rimkazol + *o*-kumarik asit ve rimkazol + kurkumin ikili kombinasyonlarının 25 µM ve 12.5 µM konsantrasyonlarda sinerjistik etki ( $CDI < 1$ ), 6.25 µM konsantrasyonda antagonist etki ( $CDI > 1$ ) ve 3.125 µM konsantrasyonda additif etki ( $CDI = 1$ ) gösterdiği belirlenmiştir.

Janicke ve diğerleri (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *p*-kumarik asit ve ferulik asitin, Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve hücre döngüsü faz dağılımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücreleri 1500 µM ferulik asit ile muamele ettikten 2 ve 3 gün sonra Caco-2 hücre canlılığının kontrole göre sırasıyla %75 ve %43 oranında azaldığını belirlemişlerdir. Aynı şekilde Caco-2 hücreleri 1500 µM *p*-kumarik asit ile muamele edildikten 2 ve 3 gün sonra hücre sayısı kontrole göre sırasıyla %74 ve %55 oranında azalmıştır (Rosa vd., 2016; Janicke vd., 2005). Bouzaiene ve diğerleri (2015) tarafından kafeik, kumarik ve ferulik asitlerin 50-1000 µM konsantrasyonlarının A549 ve HT29-D4 kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyondan sonra MTT yöntemi kullanılarak sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Her üç fenolik asitin de A549 ve HT29-D4 kanser hücrelerinin çoğalmasını, konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiş; kumarik asitin A549 kanser hücrelerinde % hücre canlılık oranları 1000, 500 200 100 ve 50 µM konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur (Bouzaiene vd., 2015). Çalışmamızda *p*-kumarik asitin rimkazol ile kombine uygulamalarının hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre 12.5 µM konsantrasyonda A549 hücreleri üzerinde kuvvetli sinerjistik etki ( $CDI < 0.7$ ) gösterdiği belirlenmiştir. MTT sonuçlarına göre hücre canlılıklarının konsantrasyona bağlı sonuçlarında *p*-kumarik asitin rimkazol ile kombine uygulamalarının en çok Caco-2 hücreleri üzerinde ve 25 µM konsantrasyonda hücre canlılığını azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. *p*-Kumarik asitin tekli ve rimkazol ile kombin uygulamalarının Caco-2 kolon kanseri, A549 akciğer kanseri ve 3T3 sağlıklı fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkileri değerlendirildiğinde, antikanser ve sitotoksik etkileri literatürlerde yer alan çalışmaları destekler niteliktedir.

Sen ve diğerleri (2013) tarafından *o*-kumarik asitin insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerinde birden fazla yolu aktive ederek antikanserojen aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda *o*-kumarik asitin yüksek kanserojen aktivasyon ve ilaç etkileşim potansiyeline

sahip olması nedeniyle kullanılmadan önce ciddi önlemler alınması gerekliliği belirtilmiştir (Sen ve ark., 2013). Yine Sen ve diğerleri (2015) tarafından *o*-kumarik asitin HepG2 hepatosellüler kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyonundan sonra bu hücreler üzerinde doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği değerlendirilmiştir. 2.5 mM ve 5 mM *o*-kumarik asit ile muamele edilen HepG2 kanser hücrelerinin canlılıkları kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında sırasıyla %11.1 ve %31.3 azaldığı gösterilmiştir (Sen vd., 2015). Çalışmamızda MTT sonuçlarına göre hücre canlılıklarının konsantrasyona bağlı sonuçlarında *o*-kumarik asitin rimkazol ile kombine uygulamalarının en çok Caco-2 hücreleri üzerinde ve 25 µM konsantrasyonda hücre canlılığını azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. *o*-Kumarik asitin rimkazol ile kombine uygulamalarının hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre 25 µM konsantrasyonda hem 3T3 hem de A549 hücreleri üzerinde kuvvetli sinerjistik etki ( $CDI < 0.7$ ) gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde *o*-kumarik asitin Caco-2, A549 ve 3T3 hücreleri üzerine etkisi ile ilgili önceden yapılmış herhangi bir çalışma verisine ulaşamamıştır. Bu tez çalışmasında *o*-kumarik asitin tekli ve rimkazol ile kombine uygulamalarının Caco-2 kolon kanseri ve A549 akciğer kanseri ve 3T3 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ilk kez çalışılmıştır. Bu sebeple *o*-kumarik asitin tekli ve kombin uygulamalarının Caco-2, A549 ve 3T3 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği değerlendirilmektedir.

Kurkuminin antitümör mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamasına rağmen (Liu vd., 2017) lösemi, lenfoma, gastrointestinal kanserler, genitoüriner kanserler, meme kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri, melanom, nörolojik kanserler, baş/boyun yassı hücreli karsinom ve sarkom gibi birden fazla hedefi etkileme özelliği rapor edilmiştir (Anand vd., 2008). Dikmen ve diğerleri (2010) tarafından HL-60 insan lösemi hücreleri 10 µM, 15 µM, 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarda kurkumin ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Kurkuminin HL-60 kanser hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak büyümeyi inhibe ettiği; hücre canlılıklarının ise 24 saatte 15 µM, 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarda; 48 saatte 10 µM, 15 µM, 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarda belirgin bir şekilde düştüğü belirlenmiştir (Dikmen vd., 2010). Liu ve diğerleri (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, A549 akciğer kanseri hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 10, 20 ve 40 µM) kurkumin ile muamele edildikten sonra 24, 48, 72 ve 96 saatlerde gözlemlenmiş; kurkuminin bu kanser hücrelerinde büyümeyi konsantrasyon ve zamana bağlı inhibe edebileceği gösterilmiştir (Liu vd., 2017). Lev-Ari ve diğerleri tarafından (2005) yapılan bir çalışmada HT-29 ve IEC-18-K-*ras* (expressing high levels of COX-2), Caco-2 (expressing low level of COX-2) ve SW-480 (no expression of COX-

2) hücre hatları farklı konsantrasyonlarda kurkumin (0-20  $\mu\text{mol/L}$ ) muamele edilmiş, kurkuminin (10-15  $\mu\text{mol/L}$ ) konsantrasyonları hücre büyümesi üzerinde sinerjistik inhibitör etki göstermiştir (Lev-Ari vd., 2005). Çalışmamızda MTT sonuçlarına göre hücre canlılıklarının konsantrasyona bağlı sonuçlarında *o*-kumarik asitin rimkazol ile kombine uygulamalarının en çok Caco-2 hücreleri üzerinde ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda hücre canlılığını azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. Kurkuminin rimkazol ile kombine uygulamalarının hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre A549 hücrelerinde 12.5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda kuvvetli sinerjistik etki ( $\text{CDI} < 0.7$ ) gösterdiği belirlenmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında literatür bilgilerinden yararlanarak sigma reseptör antagonistleri ve fenolik bileşiklerin antikanser etkilerinin, ajanların farklı konsantrasyonlarda ve rimkazol ile kombinasyonlar halinde 3T3, A549 ve Caco-2 hücrelerinde antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi; değişen konsantrasyonlarda hücreler üzerindeki sinerjistik, antagonist ve additif etkilerinin CDI hesaplamaları ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Özet olarak, çalışmamızda MTT sonuçlarına göre hücre canlılıklarının konsantrasyona bağlı sonuçlarında rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombine uygulamalarının 3T3 hücreleri üzerinde 25 µM, 12.5 µM ve 6.25 µM konsantrasyonlarda; A549 hücreleri ile Caco-2 hücreleri üzerinde 25 µM ve 12.5 µM konsantrasyonlarda hücre canlılıklarında belirgin azalma belirlenmiş olup, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve kurkumin ile kombine uygulamalarının en çok Caco-2 hücreleri üzerinde ve 25 µM konsantrasyonda hücre canlılığını azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir.

Rimkazol ve rimkazolün *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kurkumin ile kombinasyonlarının 3T3, A549 ve Caco-2 hücrelerindeki sitotoksik etkileri konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmektedir. Hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre; rimkazolün kurkumin ile kombine uygulamalarının A549 hücreleri üzerinde 12.5 µM konsantrasyonda kuvvetli sinerjistik etki ( $CDI < 0.7$ ), rimkazolün *o*-kumarik asit ile kombine uygulamalarının 25 µM konsantrasyonda hem 3T3 hem de A549 hücreleri üzerinde kuvvetli sinerjistik etki ( $CDI < 0.7$ ), rimkazolün *p*-kumarik asit ile kombine uygulamalarının 12.5 µM konsantrasyonda A549 hücreleri üzerinde kuvvetli sinerjistik etki ( $CDI < 0.7$ ) gösterdiği belirlenmiştir.

Gerek MTT yöntemi ile yapılan sitotoksikite testleri gerekse CDI ile yapılan değerlendirmeler açısından elde edilen sonuçlar literatürlerde yer alan çalışmaları destekler nitelikte olmasının yanında ilaç kombinasyonlarının kanser tedavilerinde yürütülen çalışmalara veri sunması ve ışık tutması açısından önem taşımaktadır.

## KAYNAKÇA

- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 72 (11), 1605–1621.
- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H. (2007). Curcumin: The Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, 1–75.
- Aggarwal, B.B. and Gehlot, P. (2009). Inflammation and cancer: How friendly is the relationship for cancer patients. *Current Opinion in Pharmacology*, 9 (4), 351–369.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (4th edition). New York: Garland Science.
- Aliustaoğlu, M. (2009). Temel Kanser Fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, 22 (3), 46-49.
- American Cancer Society (2015). *Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society Inc.
- Amin A.R.M.R., Kucuk, O., Khuri, F.R., Shin, D.M. (2009). Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (16), 2712–2725.
- Ammon, H.P. and Wahl, M.A. (1991). Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Medica*, 57 (1), 1–7.
- Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Letters*, 267 (1), 133-164.
- Bacanlı, M., Taner, G., Başaran, A.A., Başaran, N. (2015). Bitkisel Kaynaklı Fenolik Yapıdaki Bileşikler ve Sağlığa Yararlı Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 4 (1), 9-16.
- Balis, J.U., Bumgarner, S.D., Paciga, J.E., Paterson, J.F., Shelley, S.A. (1984). Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction. *Experimental Lung Research*, 6 (3-4), 197–213.
- Bouzaïene, N.N., Jaziri, S.K., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., Luis, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 766, 99-105.

- Brennan, J.A., Boyle, J.O., Koch, W.M., Goodman, S.N., Hruban, R.H., Eby, Y.J., Couch M.J., Forastiere A.A., Sidransky, D. (1995). Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine*, 332 (11), 712–7.
- Brouet, I. and Ohshima, H. (1995). Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206 (2), 533–540.
- Brown, E.M., Gill, C.I.R., McDougall, G.J., Stewart, D. (2012). Mechanisms Underlying the Anti-Proliferative Effects of Berry Components in In Vitro Models of Colon Cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13 (1), 200-209.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. and Thun, M.J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine*, 348 (17), 1625–38.
- Chan, M.M., Adapala, N.S. and Fong, D. (2005). Curcumin overcomes the inhibitory effect of nitric oxide on Leishmania. *Parasitology Research*, 96 (1), 49–56.
- Chen, A., Xu, J. and Johnson, A.C. (2006). Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. *Oncogene*, 25 (2), 278–287.
- Chen, J., Tang, X.Q., Zhi, J.L., Cui, Y., Yu, H.M., Tang, E.H., Sun, S.N., Feng, J.Q., Chen, P.X. (2006). Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-İnos pathway. *Apoptosis*, 11 (6), 943-953.
- Cooper, J.R., Abdullatif, M.B., Burnett, E.C., Kempell, K.E., Conforti, F., Tolley, H., Collins, J.E., Davies, D.E. (2016). Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *Plos One*, 11 (10), e0164438.
- Corbière, V., Dirix, V., Norrenberg, S., Cappello, M., Remmelink, M., Mascart, F., (2011). Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes. *Respiratory Research*, 12 (1), 15.

- de Bruyn, M., Rybczynska, A.A., Wei, Y., Schwenkert, M., Fey, G.H., Dierckx, R.A.J.O., van Waarde A., Helfrich, W., Bremer, E. (2010). Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP)-targeted delivery of soluble TRAIL potently inhibits melanoma outgrowth in vitro and in vivo. *Molecular Cancer*, 9, 301.
- Deodhar, S.D., Sethi, R. and Srimal, R.C. (1980). Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *The Indian Journal of Medical Research*, 71, 632–634.
- Dikmen, M., Canturk, Z., Ozturk, Y., Tunali, Y. (2010). Investigation of the Apoptotic Effect of Curcumin in Human Leukemia HL-60 Cells by Using Flow Cytometry. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25 (6), 749-55.
- Dikshit, M., Rastogi, L., Shukla, R., Srimal, R.C. (1995). Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin & quinidine in the cat heart. *The Indian Journal of Medical Research*, 101, 31–35.
- Divya, C.S. and Pillai, M.R. (2006). Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 45 (5), 320-332.
- Engle, M.J., Goetz, G.S. and Alpers, D.H. (1998). Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *Journal of Cellular Physiology*, 174 (3), 362–369.
- Fogh, J., Wright, W.C. and Loveless, J.D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumours. *Journal of the National Cancer Institute*, 58 (2), 209-214.
- Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L., Audus, K.L. (1998). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*, 243 (2), 359–366.
- Georgiadis, M.O., Karoutzou, O., Foscolos, A.S., Papanastasiou, I. (2017). Sigma Receptor ( $\sigma$ R) Ligands with Antiproliferative and Anticancer Activity. *Molecules*, 22 (9), 1408.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5), 1417–1423.

- Gilmore, D.L., Liu, Y. and Matsumoto, R.R. (2004). Review of the Pharmacological and Clinical Profile of Rimcazole. *CNS Drug Reviews*, 10 (1), 1–22.
- Goel, A. and Aggarwal, B.B. (2010). Curcumin the golden spice from Indian saffron is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutrition and Cancer*, 62 (7), 919-930.
- Gribble, G.W. (1996). Five-membered Rings with One Heteroatom and Fused Carbocyclic Derivates. A.R. Katritzky, C.W. Rees and E.F.V. Scriven (Editors-in-Chief), in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* (207-257). USA: Dartmouth College.
- Gupta, S.C., Prasad, S., Kim, J.H., Patchva, S., Webb, L.J., Priyadarsini, I.K., Aggarwal, B.B. (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural Product Reports*, 28 (12), 1937–1955.
- Hao, J.Q., Li, Q., Xu, S.P., Shen, Y.X., Sun G.Y. (2008). Effect of lumiracoxib on proliferation and apoptosis of human nonsmall cell lung cancer cells in vitro. *Chinese Medical Journal*, 121 (7), 602-7.
- Happy, M., Dejoie, J., Zajac C.K., Cortez, B., Chakraborty, K., Aderemi, J., Sauane, M. (2015). Sigma 1 Receptor antagonist potentiates the anti-cancer effect of p53 by regulating ER stress, ROS production, Bax levels, and caspase-3 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456 (2), 683-688.
- Henning, S.M., Wang, P., Abgaryan, N., Vicinanza, R., de Oliveira, D.M., Zhang, Y., Lee, R.P., Carpenter, C.L., Aronson, W.J., Heber, D. (2013). Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57 (3), 483-93.
- İçli, F. ve Akbulut, H. (2005). Onkolojiye Giriş. G. İlicin, K. Biberoğlu, G. Süleymanlar, S. Ünal (Editörler), *İç Hastalıkları içinde* (2007-2014). *Ankara: Güneş Kitapevi*.
- Jaganathan, S.K., Supriyanto, E. and Mandal, M. (2013). Events associated with apoptotic effect of *p*-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19 (43), 7726-7734.

- Janicke, B., Onning, G. and Oredsson, S.M. (2005). Differential effects of ferulic acid and *p*-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (17), 6658-65.
- Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Onning, G., Akesson, B., Cirenajwis, H.M., Oredsson, S.M. (2011). The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and *p*-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutrition and Cancer*, 63 (4), 611-22.
- Karakaş, D., Arı, F. and Ulukaya, E. (2017). The MTT viability assay yields strikingly false positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 41 (6), 919-925.
- Kavradım, S.T. ve Özer Z.C. (2014). Kanser Tanısı Alan Hastalarda Umut. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 6 (2), 154-164.
- Kenfield, S.A., Stampfer, M.J., Giovannucci, E., Chan, J.M. (2011). Physical activity and survival after prostate cancer diagnosis in the health professionals follow-up study. *Journal of Clinical Oncology*, 29 (6), 726–32.
- Kiso, Y., Suzuki, Y., Watanabe, N., Oshima, Y., Hikino, H. (1983). Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes. *Planta Medica*, 49 (3), 185–187.
- Kuttan, R., Sudheeran, P.C. and Josph, C.D. (1987). Turmeric and curcumin as topical agents in cancer therapy. *Tumori*, 73 (1), 29–31.
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers (Eds.), in *The Impact of Food Bioactives on Health* (103-111). Cham: Springer.
- Lev-Ari, S., Strier, L., Kazanov, D., Madar-Shapiro, L., Dvory-Sobol, H., Pinchuk, I., Marian, B., Lichtenberg, D., Arber, N. (2005). Celecoxib and Curcumin Synergistically Inhibit the Growth of Colorectal Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 11 (18), 6738-44.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G. (1976). Continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 17 (1), 62–70.

- Liu, F., Gao, S., Yang, Y., Zhao, X., Fan, Y., Ma, W., Yang, D., Yang, A., Yu, Y. (2017). Curcumin induced autophagy anticancer effects on human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncology Letters*, 14 (3), 2775–2782.
- Lopez-Acevedo, M., Grace, L., Teoh, D., Whitaker, R., Adams, D.J, Jia, J., Nixon, A.B., Secord A.A. (2014). Dasatinib (BMS-35482) potentiates the activity of gemcitabine and docetaxel in uterine leiomyosarcoma cell lines. *Gynecologic Oncology Research and Practice*, 1, 2.
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A.I., Huppler, R.E., Gilbert, P.E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 197 (3), 517–532.
- Maurice, T., Martin-Fardon, R., Romieu, P., Matsumoto, R.R. (2002).  $\sigma$ 1 Receptor antagonists represent a new strategy against cocaine addiction and toxicity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26 (4), 499–527.
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *International Journal Women's Health*, 11, 287-299.
- Monassier, L. and Bousquet, P. (2002).  $\sigma$  Receptors: From discovery to highlights of their implications in the cardiovascular system. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 16 (1), 1–8.
- Nardone, L.L. and Andrews, S.B. (1979). Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte: Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids Lipid Metabolism*, 573 (2), 276–295.
- Park, W., Amin, A.R.M.R., Chen, Z.G. and Shin, D.M. (2013). New perspectives of curcumin in cancer prevention. *Cancer Prevention Research*, 6 (5), 387-400.
- Pollack, E.S., Nomura, A.M.Y., Heilbrun, L.K., Stemmermann, G.N., Green, S.B. (1984). Prospective study of alcohol consumption and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 310 (10), 617–621.

- Rosa, L.S., Silva, N.J.A., Soares, N.C.P., Monteiro M.C., Teodoro A.J. (2016). Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6, 2.
- Rosa, L.S., Jordão, N.A., Soares, N.C.P., de Mesquita, J.F., Monteiro, M., Teodoro, A.J. (2018). Pharmacokinetic, Antiproliferative and Apoptotic Effects of Phenolic Acids in Human Colon Adenocarcinoma Cells Using In Vitro and In Silico Approaches. *Molecules*, 23 (10), 2569.
- Rui, M., Rossi, D., Marra, A., Paolillo, M., Schinelli, S., Curti, D., Tesei, A., Cortesi, M., Zamagni, A., Laurini, E., Pricl, S., Schepmann, D., Wünsch, B., Urban, E., Pace, V., Collina, S. (2016). Synthesis and biological evaluation of new aryl-alkyl(alkenyl)-4benzylpiperidines, novel Sigma Receptor (SR) modulators, as potential anticancer-agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124, 649-665.
- Rybczynska, A.A., Dierckx, R.A., Ishiwata, K., Elsinga, P.H., van Waarde, A. (2008). Cytotoxicity of sigma-receptor ligands is associated with major changes of cellular metabolism and complete occupancy of the sigma-2 subpopulation. *Journal of Nuclear Medicine*, 49 (12), 2049-2056.
- Sambuy, Y., Angelis, I.D., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21 (1), 1-26.
- Sen, A., Atmaca, P., Terzioglu, G., Arslan, S. (2013). Anticarcinogenic Effect and Carcinogenic Potential of the Dietary Phenolic Acid: *o*-Coumaric Acid. *Natural Product Communications*, 8 (9), 1269 -1274.
- Sen, A., Terzioglu, G., Atmaca, P., Celik, G., Ozgun, O., Arslan, S. (2015). Modulatory actions of *o*-coumaric acid on carcinogen-activating cytochrome P450 isozymes and the potential for drug interactions in human hepatocarcinoma cells. *Pharmaceutical Biology*, 53 (9), 1391–1398.
- Shanmugam, M.K., Kannaiyan, R. and Sethi, G. (2011). Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: Role in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition and Cancer*, 63 (2), 161–173.

- Shanmugam, M.K., Rane, G., Kanchi, M.M., Arfuso F., Chinnathambi, A., Zayed, M.E., Alharbi, S.A., Tan, B.K.H., Kumar A.P., Sethi, G. (2015). The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules*, 20 (2), 2728–2769.
- Shapiro, D.L., Nardone, L.L., Rooney, S.A., Motoyama, E.K., Munoz, J.L. (1978). Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 530 (2), 197–207.
- Sharma, S.H., Rajamanickam, V. and Nagarajan, S. (2018). Antiproliferative effect of *p*-Coumaric acid targets UPR activation by downregulating Grp78 in colon cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 291, 16-28.
- Shishodia, S., Chaturvedi, M.M. and Aggarwal, B.B. (2007). Role of curcumin in cancer therapy. *Current Problems in Cancer*, 31 (4), 243–305.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2019). Cancer Statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69 (1), 7-34.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2020). Cancer Statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70 (1), 7-30.
- Sreejayan, M.N.R. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49 (1), 105–107.
- Swain, R.J., Kemp, S.J., Goldstraw, P., Tetley, T.D., Stevens, M.M. (2010). Assessment of Cell Line Models of Primary Human Cells by Raman Spectral Phenotyping. *Biophysical Journal*, 98 (8), 1703–1711.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, 2013, 251754.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138 (6), 2101-2114.
- Tesei, A., Cortesi, M., Zamagni, A., Arienti, C., Pignatta, S., Zanoni, M., Paolillo, M., Curti, D., Rui, M., Rossi, D., Collina, S. (2018). Sigma Receptors as Endoplasmic Reticulum

- Stress “Gatekeepers” and their Modulators as Emerging New Weapons in the Fight Against Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 711.
- Thaker, P.H., Han, L.Y., Kamat, A.A., Arevalo, J.M., Takahashi, R., Lu, C., Jennings, N.B., Armaiz-Pena, G., Bankson, J.A., Ravoori, M., Merritt, W.M., Lin, Y.G., Mangala, L.S., Kim, T.J., Coleman, R.L., Landen, C.N., Li, Y., Felix, E., Sanguino, A.M., Newman, R.A., Lloyd, M., Gershenson, D.M., Kundra, V., Lopez-Berestein, G., Lutgendorf, S.K., Cole, S.W., Sood, A.K. (2006). Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of Ovarian carcinoma. *Nature Medicine*, 12 (8), 939–944.
- Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksiste Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 112-118.
- Townsend, M.H., Anderson, M.D., Weagel, E.G., Velazquez, E.J., Weber, K.S., Robison, R.A., O'Neill, K.L. (2017). Non-small-cell lung cancer cell lines A549 and NCI-H460 express hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase on the plasma membrane. *Onco Targets and Therapy*, 2017 (10), 1921–1932.
- van Breda, S.G.J., de Kok, T.M.C.M. and van Delft, J.H.M. (2008). Mechanisms of colorectal and lung cancer prevention by vegetables: a genomic approach. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19 (3), 139-157.
- Vaupel, D.B. and Su T.P. (1987). Guinea-pig vas deferens preparation may contain both  $\sigma$  receptors and phencyclidine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 139 (1), 125-128.
- Venkatesan, N. (1998). Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *British Journal of Pharmacology*, 124 (3), 425–427.
- Walker, J.M., Bowen, W.D., Walker, F.O., Matsumoto, R.R., de Costa, B., Rice, K.C. (1990).  $\sigma$  Receptors: Biology and function. *Pharmacological Reviews*, 42 (4), 355–402.
- Wei, Y., Yang, P., Cao, S., Zhao, L. (2018). The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy. *Archives of Pharmacol Research*, 41 (1), 1–13.
- Yeh, C.T. and Yen, G.C. (2003). Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (5), 1474–9.

Zhang, Y., Li, H., Zhang, J., Zhao, C., Lu, S., Qiao, J., Han, M. (2019). The combinatory effects of natural products and chemotherapy drugs and their mechanisms in breast cancer treatment. *Phytochemistry Reviews*, 1-19.

Zhao, Y., Gao, J.L., Ji, J.W., Gao, M., Yin, Q.S., Qiu, Q.L., Wang, C., Chen, S.Z., Xu J., Liang R.S., Cai Y.Z., Wang X.F. (2014). Cytotoxicity enhancement in MDA-MB 231 cells by the combination treatment of tetrahydropalmatine and berberine derived. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 3 (2), 68-72.

**http-1:** <http://www.turkkanserdernegi.org/tr/kanser-nedir.html> (Erişim tarihi: 28.03.2020)

**http-2:** <https://gco.iarc.fr-Globocan 2018> (Erişim tarihi: 28.03.2020)

**http-3:** <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018> (Erişim tarihi: 28.03.2020)

**http-4:** <http://www.hastane.deu.edu.tr/index.php/iletisim-ulasim.html> (Erişim tarihi: 03.04.2020)

**http-5:** <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/patient-prevention-overview-pdq> (Erişim tarihi: 15.04.2020)

**http-6:** <https://www.cancer.gov/research/areas/treatment> (Erişim tarihi: 15.04.2020)

**http-7:** [www.atcc.org](http://www.atcc.org) (Erişim tarihi: 24.04.2020)

**http-8:** <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/126404/a549-cell-line-profile.pdf> (Erişim tarihi: 24.04.2020)

**http-9:** <https://cellapplications.com/fibroblast> (Erişim tarihi: 24.04.2020)

**http-10:** <https://www.nih3t3.com> (Erişim tarihi: 24.04.2020)

**http-11:** <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/primary-cell-culture.html> (Erişim tarihi: 24.04.2020)

**http-12:** <https://ibidi.com/channel-slides/197-smart-slide.html> (Erişim tarihi: 08.05.2020)

**http-13:** <https://www.sigmaaldrich.com/technical documents/protocols/biology/roche/cell proliferation-kit-i-mtt.html> (Erişim tarihi: 09.05.2020)