

**BORTEZOMİB ile ELLAJİK ASİT, FERULİK ASİT, KAFEİK ASİT
KOMBİNASYONLARININ CACO-2, A549 ve 3T3 HÜCRELERİNDE,
SİNERJİSTİK SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve DİLBER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2020

ÖZET

BORTEZOMİB ile ELLAJİK ASİT, FERULİK ASİT, KAFEİK ASİT
KOMBİNASYONLARININ CACO-2, A549 ve 3T3 HÜCRELERİNDE,
SİNERJİSTİK SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve DİLBER

Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Kanserin önlenmesi ve tedavisi için antioksidan etkileri nedeniyle birçok fenolik asitlerin kullanıldığı araştırmalara olan ilgi giderek artmaktadır. Yapılan birçok çalışmada sunulan veriler fenolik asitlerin hücre canlılığını azaltmada, hücre döngüsünü modüle etmede ve apoptoz indüksiyonu ile tümör ilerlemesini kontrol etmede önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Proteozom inhibitörlerinden biri olan bortezomibin multiple myeloma için spesifik etkisi olmakla beraber küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreas, meme kanseri gibi birçok kanser türlerinde de etkili olduğu çeşitli çalışmalarda mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, bortezomibin ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ile kombine olarak, A549, Caco-2 ve 3T3 hücre hatları üzerindeki sinerjistik sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için Caco-2, A549 ve 3T3 hücrelerinde bortezomib, ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asitin belirli konsantrasyonlarda tekli ve kombin uygulamalarının sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile araştırılmış ve her bir hücre hattı için CDI (İlaç etkileşim katsayısı) değerleri hesaplanmıştır.

Çalışma sonucunda, Caco-2 ve A549 hücrelerinde, 3.125-25 μ M konsantrasyonlar aralığında, bortezomib ile fenolik asit kombinasyonlarının kontrole göre hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiş olup, 3T3 hücrelerinde ise bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonlarının belirgin sitotoksik etkisi görülmüştür. CDI hesaplama sonuçlarına göre, 3.125 μ M konsantrasyondaki bortezomib + kafeik asit kombinasyonunun Caco-2 hücrelerinde güçlü sinerjistik etki, 3.125 μ M konsantrasyondaki bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonlarının da 3T3 hücrelerinde güçlü bir sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Fenolik asitler, Bortezomib, A549, Caco-2, Sinerjistik etki

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SYNERGISTIC CYTOTOXIC EFFECTS OF BORTEZOMIB AND ELLAGIC ACID, FERULIC ACID, CAFFEIC ACID COMBINATIONS ON CACO-2, A549 AND 3T3 CELLS

Merve DİLBER

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2020

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

There is growing interest in research using many phenolic acids due to their antioxidant effects for the prevention and treatment of cancer. The data presented in many studies have shown that phenolic acids can play important role in reducing cell viability, modulating the cell cycle and controlling tumor progression by induction of apoptosis. Although bortezomib, one of the proteasome inhibitors, has specific effect for multiple myeloma, there are various studies that it is also effective in many types of cancer.

In this thesis, it is aimed to determine the synergistic cytotoxic effects of bortezomib on A549, Caco-2 and 3T3 cell lines in combination with ellagic acid, ferulic acid and caffeic acid. The cytotoxic effects of bortezomib, ellagic acid, ferulic acid and caffeic acid in some concentrations in Caco-2, A549 and 3T3 cells were investigated by MTT method and CDI values were calculated.

As a result, it was determined that the combinations of bortezomib and phenolic acids significantly decreased cell viability on Caco-2 and A549 cells in the concentration range of 3.125-25 μ M. Bortezomib + ferulic acid and bortezomib + caffeic acid combinations showed important cytotoxic effect on 3T3 cells. According to the results of the CDI, in the 3.125 μ M the combination of bortezomib and caffeic acid showed strong synergistic effect on Caco-2 cells, while bortezomib and ferulic acid, bortezomib and caffeic acid at the same concentration showed strong synergistic effect on 3T3 cells.

Keywords: Phenolic acids, Bortezomib, A549, Caco-2, Synergistic effect

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarında, tezimin doğru bir şekilde yönlendirilip sonuçlanmasında bilgi ve birikimlerinden faydalandığım, tüm bu süre zarfında desteğini esirgemeyen, göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Yüksek lisans sürecinin tüm aşamalarında çalışmalarımızı birlikte sürdürdüğümüz değerli arkadaşım Ecz. Büşra ÇİFTÇİ'ye,

Benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan değerli eşime, hayatımın her alanında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, haklarını ödeyemeyeceğim sevgili aileme,

Sonsuz Teşekkürler...

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 aşamalardan 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 hiç bir 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
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser.....	2
2.1.1.Kanser ve hücre döngüsü.....	3
2.1.2.Apoptoz ve kanser.....	4
2.1.3.Kanserde NF-kB'nin önemi.....	5
2.1.4.Kolon kanseri.....	6
2.1.4.1. <i>Caco-2 hücre hattı</i>	8
2.1.5. Akciğer kanseri.....	10
2.1.5.1. <i>A549 hücre hattı</i>	11
2.2. Fibroblast Hücreleri.....	12
2.2.1.NIH/3T3 hücre hattı.....	13
2.3. Ubikülin-Proteozom Sistemi.....	14
2.3.1.Proteozom inhibitörleri.....	16
2.3.1.1 . <i>Bortezomib</i>	17
2.4. Fenolik Bileşikler ve Kansere İlişkisi.....	19
2.4.1.Fenolik asitler	20
2.4.1.1 . <i>Ellajik asit</i>	21
2.4.1.2 . <i>Ferulik asit</i>	23
2.4.1.3 . <i>Kafeik asit</i>	24
3. GEREÇLER.....	26

	<u>Sayfa</u>
3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	26
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	27
4. YÖNTEMLER.....	28
4.1. Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları.....	28
4.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması.....	28
4.2.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu.....	28
4.2.2. Ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bortezomib konsantrasyonlarının hazırlanması.....	28
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	28
4.3.1. Stoktan hücre çıkarma.....	28
4.3.1.1 . <i>Hücre sayımları</i>	29
4.3.2. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi.....	29
4.3.2.1 . <i>Yöntemin uygulanması</i>	30
4.3.3. Kombine konsantrasyonların sinerjistik sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.....	31
4.3.3.1 . <i>İlaç etkileşim katsayısı (CDI) hesaplama</i>	32
4.3.4. İstatistiksel analiz.....	32
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
5.1. Bortezomib, Ellajik asit, Ferulik asit, Kafeik asit ve Bortezomibin Bu Fenolik Asitlerle Kombinasyonlarının 3T3 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	33
5.2. Bortezomib, Ellajik asit, Ferulik asit, Kafeik asit ve Bortezomibin Bu Fenolik Asitlerle Kombinasyonlarının Caco-2 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	37
5.3. Bortezomib, Ellajik asit, Ferulik asit, Kafeik asit ve Bortezomibin Bu Fenolik Asitlerle Kombinasyonlarının A549 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	41
5.4. Bortezomibin Ellajik asit, Ferulik asit ve Kafeik asit ile Kombinasyonlarının 3T3, A549 ve Caco-2 Hücreleri Üzerinde Sinerjistik, Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	45

5.4.1. Bortezomibin ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asit ile kombinasyonlarının 3T3 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjist etkileşimleri.....	46
5.4.2. Bortezomibin ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asit ile kombinasyonlarının Caco-2 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjist etkileşimleri.....,	47
5.4.3. Bortezomibin ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asit ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjist etkileşimleri.....	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKÇA.....	56
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kanserın temel özellikleri.....	2
Şekil 2.2. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları.....	3
Şekil 2.3. Apoptoza giden hücrede meydana gelen morfolojik değışiklikler.....	4
Şekil 2.4. Kolon kanserinin oluşum aşamaları.....	7
Şekil 2.5. Düşük yoğunlukta (A) ve Yüksek yoğunlukta (B) Caco-2 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	9
Şekil 2.6. Düşük yoğunlukta (A) ve yüksek yoğunlukta (B) A 549 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	12
Şekil 2.7. Fibroblastlar ve indüksiyon durumunda farklılaşmaları.....	13
Şekil 2.8. Düşük yoğunlukta (A) ve yüksek yoğunlukta (B) 3T3 hücreleri.....	14
Şekil 2.9. 20S ve 26S proteazomunun şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.10. Ubikütün-Proteozom sistemi.....	16
Şekil 2.11. Bortezomibin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.12. Bortezomibin etki mekanizması.....	18
Şekil 2.13. Ellajik asitin kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.14. Ferulik asit kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.15. Kafeik asit kimyasal yapısı.....	24
Şekil 4.1. Tetrazoliumun Mitokondriyal redüktaz enzimleri aracılığıyla formazan tuzuna indirgenmesi.....	30
Şekil 4.2. Hücre plaklarına MTT nin uygulanması.....	31
Şekil 5.1. 3T3 hücrelerinde 25 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	34
Şekil 5.2. 3T3 hücrelerinde 12.5 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	35

Şekil 5.3. 3T3 hücrelerinde 6.25 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	36
Şekil 5.4. 3T3 hücrelerinde 3.125 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	37
Şekil 5.5. Caco-2 hücrelerinde 25 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	38
Şekil 5.6. Caco-2 hücrelerinde 12.5 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	39
Şekil 5.7. Caco-2 hücrelerinde 6.25 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	40
Şekil 5.8. Caco-2 hücrelerinde 3.125 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	41
Şekil 5.9. A549 hücrelerinde 25 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	42

Şekil 5.10. A549 hücrelerinde 12.5 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	43
Şekil 5.11. A549 hücrelerinde 6.25 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	44
Şekil 5.12. A549 hücrelerinde 3.125 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları.....	45

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 5.1. 3T3 hücrelerine bortezomib, ellajik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	46
Tablo 5.2. 3T3 hücrelerine bortezomib, ferulik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	46
Tablo 5.3. 3T3 hücrelerine bortezomib, kafeik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	47
Tablo 5.4. Caco-2 hücrelerine bortezomib, ellajik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	47
Tablo 5.5. Caco-2 hücrelerine bortezomib, ferulik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	48
Tablo 5.6. Caco-2 hücrelerine bortezomib, kafeik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	48
Tablo 5.7. A549 hücrelerine bortezomib, ellajik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	49
Tablo 5.8. A549 hücrelerine bortezomib, ferulik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	49
Tablo 5.9. A549 hücrelerine bortezomib, kafeik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları.....	50

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	: Protein Kinaz B
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
ATCC	: Amerikan Tissue Culture Collection (Amerikan Doku Kültürü Koleksiyonu)
CDI	: İlaç Etkileşim Katsayısı
CI	: Hücre İndeksi
CID	: Kimyasal İndüklü Dimerizasyon
CO ₂	: Karbondioksit
CRC	: Kolorektal Kanser
DCC	: Deleted in Colorectal Cancer
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ECM	: Ekstraselüler Matriks
eGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
KHDAK	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
KRAS	: Kirsten sıçan sarkomaviral onkogen
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NF-κB	: Nükleer Faktör Kabba B
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PTEN	: Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPM	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
TEER	: Transepitelyal Elektrik Direnci
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
UB	: Ubikütin
UPS	: Ubikütin-Proteazom Sistem

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hücrelerinin sürekli, kontrolsüz çoğalması, verilen ilaçlara direnç kazanması ve metastaz yaparak tüm vücuda yayılabilme özelliğine sahip olması kanserin karmaşık bir mekanizma olmasına neden olmuştur. Bu yüzden kanser tedavisi için hala yeni tedavi yolları aranmaktadır (Engür ve Dikmen, 2015).

Bir proteozom inhibitörü olan bortezomib, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2003 yılında onaylanmasından bu yana klinik gelişmeler hızlanmıştır ve şu anda dünya çapında 50'den fazla ülkede onaylanmıştır (Field-Smith vd., 2006). Bortezomibin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri için birçok mekanizmanın sorumlu olduğu belirlenmiştir (Bruning vd., 2011). Yapılan çalışmalar bortezomibin multiple myeloma için spesifik etkisi olmasının yanında kolon, akciğer, meme ve prostat kanserleri gibi birçok çeşit solid tümörü tedavi etmede başarılı olduğunu göstermiştir (Roeten vd., 2018).

Kemoterapötik ajanların toksik olduğu ve ciddi yan etkileri olduğu bilinmektedir. Bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin, birçok işlevleri ve terapötik aktiviteleri olmasıyla birlikte toksisite ve yan etkilerinin yok denecek kadar az olması kanser tedavisinde kullanılan doğal bileşikler üzerindeki çalışmalara olan ilgiyi arttırmıştır. Şu anda kullanılan antikanser ilaçların %60'ından fazlasının doğal kaynaklardan türetildiği bilinmektedir. Bu nedenle, doğal bileşiklerden daha etkili kemoterapötik ajanların geliştirilmesi ve farklı mekanizmalarla apoptozu indüklemeye veya kanser önleme yeteneklerinin araştırılması, kanser çalışmalarında önemli odak noktaları haline gelmiştir. Araştırma bulguları, çeşitli fenolik bileşiklerin koruyucu etkileri olduğunu ve apoptoz, istila, anjiyogenez ve metastaz yollarındaki genlerin ifadelerini düzenleyerek karsinogenezi inhibe edebildiğini göstermiştir. Ayrıca, bu fenolik bileşiklerin bazılarının standart tedavide kullanılan kemoterapötik ajanlarla sinerjistik bir etkisi olduğu bulunmuş olup, birçok klinik öncesi çalışmada bazı solid kanser tedavilerinde kemoterapi ilaçlarının etkilerini artırma potansiyeli belirlenmiştir (Zhang vd., 2019; Rosa vd., 2018; Eroglu vd., 2018).

Biz de bu çalışmada, proteozom inhibitörü bortezomib ile ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asitin tekli ve bortezomib ile bu fenolik asitlerin kombine olarak insan akciğer kanseri hücre hattı A549, insan kolorektal hücre hattı Caco-2 ve sağlıklı bir hücre hattı olan 3T3 üzerindeki sinerjistik sitotoksik etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücre döngüsünün bozulması nedeni ile hücrelerin anormal bir şekilde kontrolsüz büyüüp çoğalmasıyla oluşan metabolik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalık, apoptoz, oksidatif stres, mutasyonlar ve hipoksi gibi nedenlerle hücresel fonksiyonların görevini yerine getirememesiyle ya da sigaraya ek olarak, radyasyona, ultraviyole ışınlarına, uzun süre çevre kirliliğine maruz kalma ve stres gibi dış faktörlerle ortaya çıkmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011), [http-1].



Şekil 2.1. Kanserin temel özellikleri (El- Tanani vd., 2016)

2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre, kanser 172 ülkenin 91'inde 70 yaşın altındaki bireylerde birinci veya ikinci önde gelen ölüm nedenlerindendir. Kanser türleri arasında en sık teşhis edilip, en çok ölüme neden olan akciğer kanseridir. Toplam kanser ölümlerinin %18.4'ünü oluşturur. Bunu %11.6 ile meme kanseri, %10.2 prostat kanseri %9.2 kolorektal kanser takip etmektedir (Bray vd., 2018).

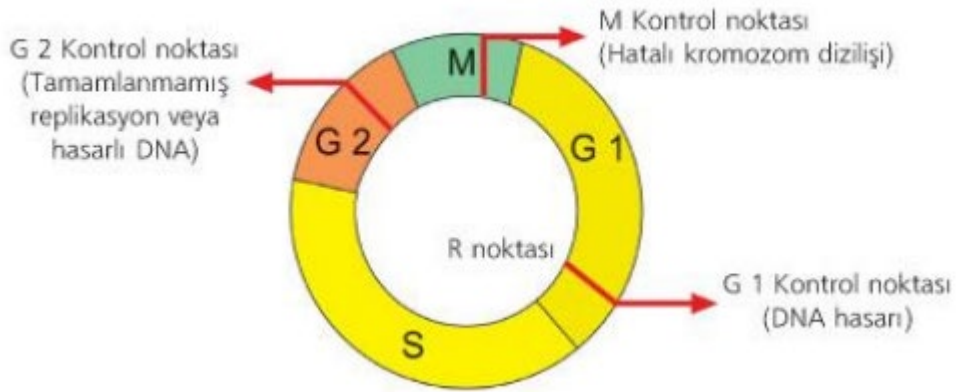
Kanserin ilerlemesi; kontrolsüz hücre büyümesi ve farklılaşması, anjiyogenez, artan proliferatif sinyalleşme, hücre ölümüne direnç ve son olarak yayılma ve metastaz

aşamalarıyla gerçekleşmektedir. Kanseri kontrol altına alıp tedavi etmek için bozulmuş dengeyi onarmaya çalışan bu moleküler yolları hedeflemek gerekmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011), [http-1].

2.1.1. Kanser ve hücre döngüsü

Hücre döngüsü, hücrenin kendisine tam kopyasını üretme kabiliyeti veren çok iyi organize edilmiş moleküler olayların bir dizisidir. Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) replikasyonu ve replike edilmiş kromozomların ayrılması, hücre döngüsünün ana olaylarıdır. Ökaryot hücre siklusu mitoz, G₁, S ve G₂ fazlarından oluşur. G₀'da dinlenme aşamasında olan, bölünmeyen hücreler bulunur. G₁ fazı büyüme ve DNA sentezine hazırlık, S fazı DNA sentezi, G₂ fazı büyüme ve mitoz hazırlık, mitoz bölünme gerçekleşir (Vermeulen vd., 2003-a).

Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre siklusunda G-S geçişinde, G-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktalarında hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği kararı verilir (Şekil 2.2) (Vermeulen vd., 2003-b).



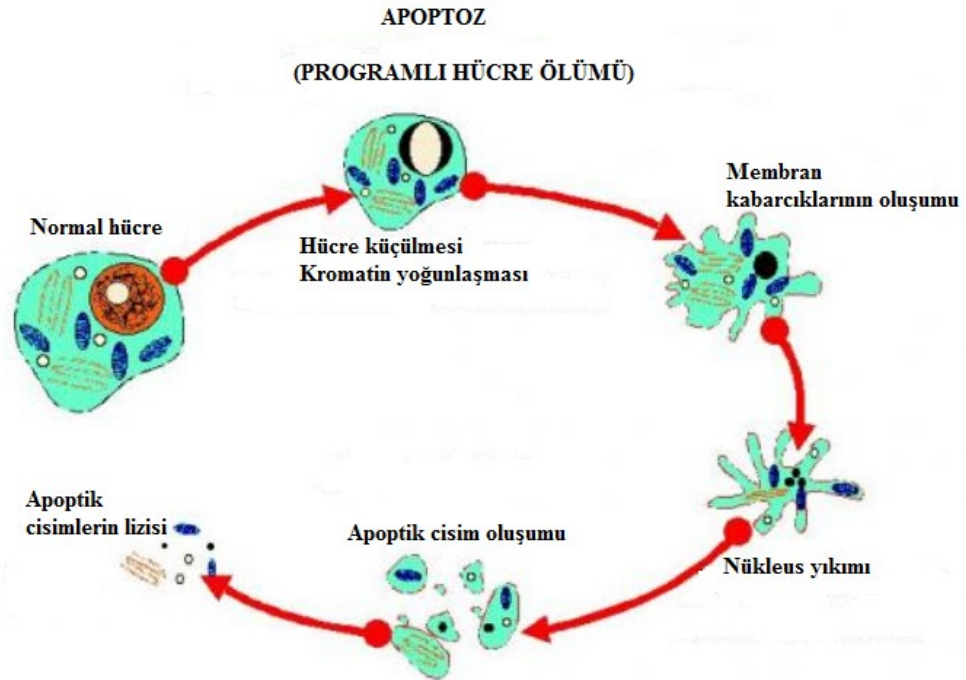
Şekil 2.2. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları (Vermeulen vd., 2003-b)

Hücre döngüsü içindeki olayları düzenleyen ve kontrol eden etkileşimler çok sayıda ve komplekstir. Hücre döngüsünün düzenlenmesindeki hatalar hücre bölünmesinin kontrolünün bozulmasına neden olur. Hücre döngüsü kontrolünün düzensiz olması kanserin temel bir özelliğidir. Normal hücreler, yalnızca doku büyümesi için bir

gereksinimi gösteren gelişimsel veya diğer mitojenik sinyallere yanıt olarak çoğalırken, kanser hücrelerinin çoğalması esasen kontrol edilmeden ilerler. Bu nedenle, kanser hücreleri iç ve dış proliferasyon inhibitör sinyallerindeki kusurlar nedeniyle çoğalır (Nakayama ve Nakayama, 2006). Genellikle kanserde düzenlenmeyen hücre döngüsünde sınırlayıcı bir adım, döngünün ilk aşamasındaki (G₁) hücrelerin S fazına ilerlemesidir (Gloria, 2014).

2.1.2. Apoptoz ve kanser

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, kendi kendini yok eden dahili olarak tasarlanmış hücre ölümünün önemli bir şeklidir. Membran kabarcıkları oluşumu, kromatin ve nükleer yoğunlaşma, apoptotik cisimlerin ayrılması ve DNA parçalanması gibi çeşitli morfolojik değişikliklerle tamamlanmaktadır (Earnshaw, 1995). (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. Apoptoza giden hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler (Gültekin vd., 2008)

Apoptoz, organizmaların gelişim sırasında ya da hücrel stresini takiben vücuttaki gereksiz veya sağlıklı hücreleri ortadan kaldırmaya yönelik bir mekanizmadır. Fakat bu mekanizma kanser hücrelerinde görülen mutasyonlar nedeniyle devre dışı bırakılır. Böylelikle kanser hücreleri kendilerini korumaya alıp sağkalımlarını sağlayarak

proliferasyonlarına devam ederler. Bu sürece dahil olan moleküller, yeni geliştirilen ajanların etkinliğini göstermek için önemlidir (Fernald ve Kurokawa, 2013).

Apoptotik mekanizmaların anlaşılması, kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesini sağlar. Bu tür stratejiler tümör hücrelerinde ölümün indüklenmesine ve radyasyon ve sitotoksik ajanlarla tedavilere daha yüksek yanıt verilmesine dayanmaktadır (Soares vd., 2017).

Uygun apoptotik sinyalizasyon, hücre ölümü ve hücre hayatta kalması arasında sağlıklı bir dengeyi korumak ve apoptozun belirgin bir kanser belirtisi olarak kaçığının ortaya çıkmasıyla vurgulandığı gibi genom bütünlüğünü korumak için temel olarak önemlidir (Plati vd., 2011).

Apoptotik yollar, transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel olarak kanser hücreleri tarafından değiştirilebilir ve kanser hücreleri apoptozdan kaçınmak için çeşitli stratejiler kullanabilir (Fulda, 2010).

2.1.3. Kanserde NF-kB'nin önemi

Nükleer Faktör kabba B (NF-kB), DNA'ya doğrudan bağlanarak genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Dolayısıyla immünitede, hücre sağkalımında, hücre çoğalmasında, öğrenme ve bellek süreçlerinde görev alır. NF-kB bir heterodimerdir ve memeli genomunda p52, p50, RelA, RelB ve c-Rel olmak üzere beş alt birimden meydana gelir (Engür ve Dikmen, 2015).

Yapılan ve yapılmakta olan pek çok çalışma ile NF-kB'yi bağlayan bölgeler bulunduran ve dolayısıyla NF-kB ile ilişkilendirilen yüzlerce gen bulunmuştur. Bu bölgelerin varlığı NF-kB'nin olası görevlerini aydınlatmak için önemlidir. NF-kB'nin olağan dışı aktivasyonu ve inhibisyonu metabolik, inflamatuvar ve nörodejeneratif ve kanser gibi pek çok hastalığın patofizyolojik süreçlerinde rol oynar. Bu bölgelerin varlığı NF-kB'nin hematopoez, transformasyon, hücre proliferasyonu, immünite, hücre sağkalımı, metastaz, anjiogenez ve invazyon gibi görevleri olduğunu göstermektedir (Ekinci ve Memis, 2008).

NF-kB tarafından doğrudan aktive edilen antiapoptotik genler, apoptozun hücrel inhibitörlerini (c-IAP1, c-IAP2 ve IXAP), TNF reseptörüne bağlı faktörleri (TRAF1 ve TRAF2), Bcl-2 homologu A1/Bfl-1 ve IEX-IL'Yİ içerir (Wang vd., 1998).

NF-kB ayrıca hücrel apoptoz ve proliferasyon derecesinin belirlenmesinde kritik bir element olan hücre döngüsünün kontrolünde de etki eder. NF-kB, promoterindeki

birden çok bölgeye doğrudan bağlanarak G₁-S-faz ilerlemesinin pozitif bir regülatörü olan siklin D₁'in ekspresyonunu aktive eder (Guttridge vd., 1999). NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu, siklin D₁ aktivitesini ve ardından retinoblastoma proteininin fosforilasyonunu azaltarak hücre döngüsünün ilerlemesinin gecikmesine neden olabilir. Bu bozulmuş hücre döngüsü ilerlemesi, siklin D₁'in ektopik ekspresyonu ile kurtarılabilir. Bu nedenle, NF-kB tarafından uyarılan apoptozun baskılanması, büyüme kontrolünün farklı yönlerinde yer alan çoklu genlerin düzenlenmesini içerir (Hinz, 1997).

Bazı fenolik bileşiklerin NF-kB aktivitesini inhibe edebildiği ve apoptozu indükleyebildiği gözlemlenmiştir. Bunun da bazı kanserlerin ölüm oranını azaltmasına katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Holmes-Mcnary ve Baldwin, 2000).

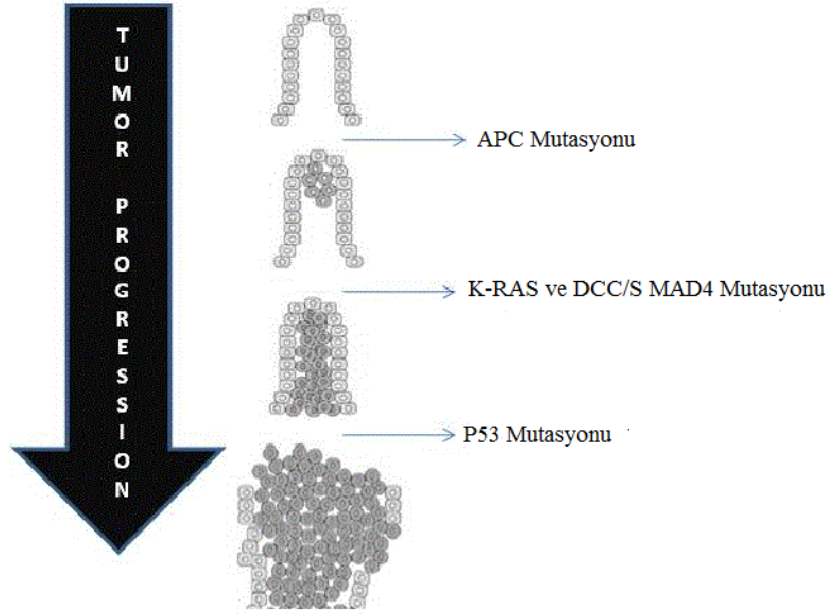
2.1.4. Kolon kanseri

Kolorektal kanser (CRC), kolon ve rektumda kanser gelişimini ifade eder. Dünya çapında en yaygın üçüncü kanser olup, CRC hastalarının yaklaşık %56'sı ölmektedir (Bray vd., 2018; Torre vd., 2015; Riihimaki vd., 2016). Her yıl dünya çapında 1 milyondan fazla yeni kolorektal kanser vakası tespit edilmektedir (Terzia vd., 2010).

CRC gelişimine çeşitli faktörler neden olmaktadır. Genetik yatkınlık, yaş, yaşam tarzı ve özellikle diyet kolorektal kanser gelişimi için en önemli faktörlerden bazılarıdır (Johnson, 2007).

Kolon epitel hücreleri hızlı çoğalmaları sebebiyle potansiyel olarak mutajenik, kanserojen gıda kalıntılarına ve bakteri metabolitlerine maruz kalmaktadırlar (Janicke vd., 2005).

CRC gelişimi, normal kolon mukozasının kolon adenokarsinomuna ve daha sonra karsinoma dönüşmesine yol açan mutasyonların veya epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanmaktadır (van Breda vd., 2008). Bu mutasyonel olay, adenom-karsinom sekansı olarak adlandırılan bir yoldaki başlangıç aşamasıdır ve Adenomatosis Poliposis Coli (APC), K-ras, Deleted in Colorectal Cancer (DCC) ve p53 (Şekil 2.4) gibi genleri içerir ve üç aşama ile karakterize edilir: i. Kalıcı DNA hasarı ile sonuçlanan karsinojenlere maruz kalma veya bunların alımını içeren başlatma. ii. Preneoplastik bir lezyon oluşturan uzun bir anormal hücre replikasyonu süreci ve iii. Preneoplastik hücrelerin malign hücrelere kademeli olarak dönüştürülmesini içeren tümör oluşumunun ilerlemesi (Brown vd., 2012; Ng, 2011)



Şekil 2.4. Kolon kanserinin oluşum aşamaları (Brown vd., 2012)

CRC tedavisi için cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere multimodalite tedavisi uygulanmaktadır. Bununla birlikte, ileri evrede CRC hastalarında beş yıllık sağkalım zayıftır ve kemoterapi direnci bu bozukluğun tedavisi için çözülmemiş bir problem olmaya devam etmektedir (Brenner vd., 2014).

Yapılan bazı çalışmalarda fenolik asitlerin kolon kanseri hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini ve kısmen oksidan aracılı mekanizmalar yoluyla kanser hücresi apoptozunu indükleyebileceğini bulmuştur (Rosa vd., 2016). Buna örnek olarak yapılan bir çalışmada kafeik asitin, 2500 μM konsantrasyonunda HT 29 kolon kanseri hücrelerinin büyümesini %50 inhibe ettiği görülmüştür (Jaganathan, 2012).

Ferulik asit kullanılarak yapılan önceki çalışmalar kolon kanseri hücreleri üzerindeki hücre canlılığı üzerinde inhibe edici bir etki göstermiştir (Mori vd., 1999). Bu etki, Hudson ve arkadaşları (2000) tarafından sıçanlarda *in vivo* testlerle doğrulanmıştır (Hudson vd., 2000).

Rosa ve arkadaşlarının 2018 yılında HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerinde yaptığı bir çalışmada ferulik asitin 0.1 ve 1.0 μM konsantrasyonları ile tedavisinden sonra hücre canlılığında önemli bir azalmayı (%35) desteklemiştir. Benzer şekilde 5, 10, 25, 50, 100

μM gibi daha yüksek konsantrasyonlarda ise hücre canlılığında daha yüksek bir azalma (%63) gözlemlenmiştir (Rosa vd., 2018).

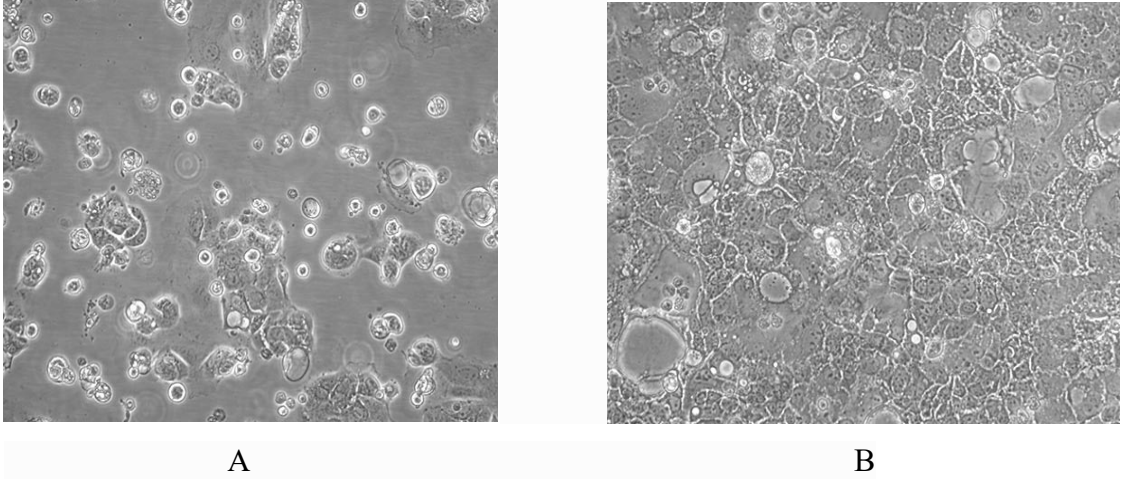
Janicke ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı bir çalışmada, 1500 μM konsantrasyondaki ferulik asitin 2-3 günlük tedavisinden sonra Caco-2 hücrelerinin çoğalmasını (%43-75) inhibe ettiğini göstermiştir (Janicke vd., 2005).

Yapılan bir çalışmada kafeik asit türevlerinin insan kolorektal hücreleri olan HCT-116 ve SW-480 de çoğalması üzerindeki önleyici etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kafeik asit türevlerinin 5, 10, 20, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında HCT-116 ve SW-480 hücrelerinin proliferasyonunu, konsantrasyonun artışına paralel olarak önemli ölçüde (%58-64) inhibe ettiği görülmüştür (Chiang vd., 2014).

Dihidrokafeik ve dihidroferulik asitin iki farklı Caco-2 ve SW480 kolon adenokarsinom hücrelerinde antiproliferatif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 200 μM ferulik asidin SW480 hücre proliferasyonunu sırasıyla %40.8 ve %59.9 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Dihidrokafeik ve dihidroferulik asitin, Caco-2'de IC50 değerleri sırasıyla 71.7 ± 1.1 ve 83.1 ± 1.1 $\mu\text{mol/L}$ olduğu gözlemlenip her iki hücre hattında antiproliferatif etkili olduğu belirlenmiştir (Martini vd., 2019).

2.1.4.1 . Caco-2 hücre hattı

Caco-2, Slogen-Kettering Kanser Araştırma Enstitüsü'nde Jorgen Fogh tarafından bir insan kolorektal adenokarsinomundan izole edilmiştir (Fogh vd., 1977). Kuruluşundan bu yana geçen 35 yıl boyunca, Caco-2 hücreleri dünya çapında bir dizi laboratuvar da çoğaltılmıştır. Farklı kültür koşulları ve farklı sayıda pasaj nedeniyle, Caco-2 hücreleri genellikle farklı özellikler kazanmıştır. Böylece enterositlere özgü farklılaşma markırlarının ekspresyonu, pasaj sayısının artmasıyla değişmektedir (Artursson ve Karlsson, 1991). Ayrıca, transepitelyal elektrik direnci (TEER) ve proliferasyon oranı gibi parametrelerin geçiş sayısı ile arttığı bildirilmiştir (Briske Andersson vd., 1997).



Şekil 2.5. Düşük yoğunlukta (A) ve Yüksek yoğunlukta (B) Caco-2 hücrelerinin morfolojik görüntüleri ([http- 2](http-2))

Caco-2 hücrelerinin normal insan bağırsak epitelinde bulunan çok sayıda enzim ve taşıyıcı proteini ifade ettiği tespit edilmesine rağmen, son çalışmalar Caco-2, HT29 ve normal insan bağırsak epiteli gibi dönüştürülmüş epitel hücre hatlarının gen ekspresyon profilleri arasında farklılıklar olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hücre hatları ile normal epitel arasında farklılıklar bulunmamakta, gen ekspresyon profillerinin temel bileşen analizi Caco-2 ve HT29 hücre hatları arasında da farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır (Bourgine ve Billaut-Laden, 2012). Normal bağırsak epiteli birkaç farklı hücre tipinden oluşmaktadır ve gen ekspresyon profillerindeki farklılıklar sadece tüm gastrointestinal sistem boyunca mukozal epitelde değil, aynı zamanda kript-villus ekseninde de gözlemlenmektedir (Anderle ve Sengstag, 2005). Bu durumda, Caco-2 hücre modelindeki deneylerin veri analizi, *in vivo* durumla doğrudan karşılaştırılamaz. Yine de, Caco-2 modeli gibi bağırsak epitel hücre modelleri, kolaylığı ve tekrarlanabilirliği nedeniyle laboratuvarlararası sonuçların karşılaştırılmasına izin veren birçok avantaja sahiptir. Ayrıca, hücre hatları biyoaktif moleküllerin etkilerinin izlenmesi için avantajlıdır (Lea, 2015).

Caco-2 hücreleri, olgun ince bağırsak enterositlerinin fonksiyonel ve morfolojik (polarize kolonar epitelyum) özelliklerini ifade etmek için kendiliğinden farklılaşmaktadır. Polarize Caco-2 hücreleri, HT29 hücrelerine göre 4 kat daha yüksek TEER değerleri göstermekte, yani *in vivo* duruma daha benzerdir. Caco-2 hücreleri, normal epitelde bulunan çoğu reseptör, taşıyıcı ve aminopeptidaz, esteraz ve sülfataz

gibi ilaç metabolize edici enzimleri eksprese etmektedir. Bununla birlikte, hiçbir P-450 metabolize edici enzim aktivitesi rapor edilmemiştir (Lea, 2015).

2.1.5. Akciğer kanseri

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan akciğer kanseri, dünya çapında hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık rastlanan ve ölüme neden olan malign kanser türüdür (Rivera ve Wakelee, 2016).

Akciğer kanseri, teşhis edilen kanser vakalarının %12'sini oluşturur ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin toplam %23'üne neden olarak meme, kolon ve prostat kanserinin neden olduğu kombine mortaliteyi aşmaktadır (Zhu vd., 2016).

Yapılan araştırmalara göre 2018 yılında 2.1 milyon yeni akciğer kanseri vakası ve akciğer kanserinden kaynaklı yaklaşık 1.8 milyon ölüm meydana gelmiştir (Bray vd., 2018).

Akciğer kanseri gelişiminden %95 oranında sigara sorumludur. Diğer etkili olduğu belirtilen yaş, cinsiyet, ırk, hava kirliliği, meslek, radyasyon, geçirilmiş akciğer hastalığı, diyet, viral enfeksiyonlar, genetik ve immünolojik faktörlerin tümü %5 oranında etkilidir (Halilçolar vd., 1999).

Akciğer kanseri, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Bu ayrım tedavi seçimi ve prognozu belirlemektedir (Travis vd., 1995).

Akciğer kanseri insidansının yüzde 85'i küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tipine (KHDAK) aittir. Bundan dolayı, hastaların yaşam süresini uzatmak ve ağrıları azaltıcı bir seçenek sunmak için bu kanser tipini tedavi etmede güvenilir ve etkili bir tedavi yaklaşımı ve terapötikler geliştirmek çok önemlidir (Guo vd., 2018).

Hastalık oluşumunda sürekli olarak karsinojen maruziyeti sonucu genetik materyal de zarar görmektedir. Hücrenin kanserleşmesi hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki değişiklikler ile gerçekleşir. İki ana gen sınıfını hedef alan mutasyonlar vardır. Bunlar hücre çoğalmasını uyaran genler ve tümör baskılayıcı genler şeklindedir. Hem küçük hücreli hem de küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde bulunabilir. Bu kanserojen hasar, hücrelerin artışında rol oynayan c-myc, ras onkogenlerin aktive olması ya da Rb, p53 adıyla anılan tümör baskılayıcı genlerin inhibe edilmesi sonucu oluşabilir. Hücrelerin çoğalmasını kontrol eden genlerde oluşan hasar akciğer kanseri oluşumunun temel nedenidir. Yapılan çalışmalar proto-onkogen olarak adlandırılan genlerin kanserojen

uyarısı ile onkogen haline dönüşerek, karsinogenezdeki etkinlikleri belirlenmiştir. Küçük hücreli kanserlerde özellikle c-myc ve Rb, küçük hücreli olmayan kanserlerde ise RAS ve p16 genlerinde mutasyon vardır (Turner vd., 2010).

Akciğer karsinogenezinde yol aktivasyonu, Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Kirsten sıçan sarkomaviral onkogen (KRAS), Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) veya Protein kinaz B (AKT)'de mutasyonların aktive edilmesi, PIK3CA amplifikasyonu veya tümör baskılayıcı gen Protein tirozin fosfataz ve tensin homologu (PTEN) tarafından negatif regülasyon kaybı dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşir (Cooper vd., 2013).

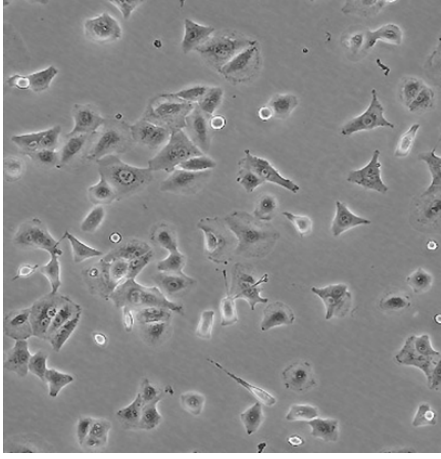
Akciğer kanseri malign tümör olması nedeniyle proliferasyonu diğer kanser türlerine kıyasla daha hızlı olmaktadır. Ölüm oranı en yüksek olan akciğer kanserinin proliferasyonun önlenmesi ve mekanizmasının anlaşılması amacıyla yapılan çalışmalar akciğer hastalığının önlenmesinde ve tedavisinde büyük önem arz etmektedir (Sethi vd., 1999).

Başka bir çalışmada ferulik asit türevi olan FXS-3'ün insan akciğer kanseri A549 hücreleri proliferasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için bir MTT analizi yapılmıştır. FXS-3'ün 24 saat boyunca 0.2-50 μ M arasında değişen konsantrasyonlardaki uygulamasından sonra, hücre canlılığının %92.27'den %14.63'e düştüğü görülmüştür. Bu da FXS-3'ün A549 hücrelerinin büyümesini doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir (Yue vd., 2019).

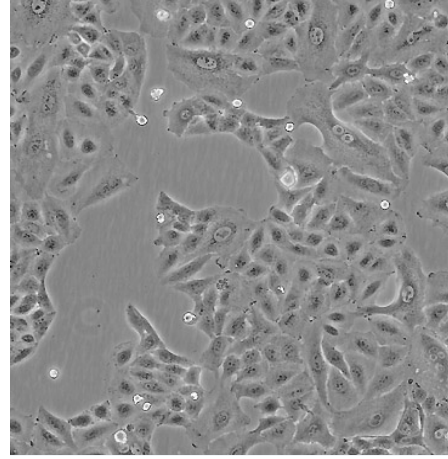
Liu ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları bir çalışmada ise 48. saatteki MTT deneyi sonucunda, ellajik asidin A549 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre konsantrasyon artışına (5, 10 ve 20 μ M) bağlı olarak önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (Liu vd., 2018).

2.1.5.1 A549 hücre hattı

A549 hücre hattı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak da adlandırılan insan alveolar bazal epitelyum hücresi kaynaklı adhere hücre özelliğine sahip bir hücre hattıdır [http- 3].



A



B

Şekil 2.6. Düşük yoğunlukta (A) ve yüksek yoğunlukta (B) A549 hücrelerinin morfolojik görüntüleri [http- 4].

A549 hücre hattı, 1973'te bir pulmoner adenokarsinomdan 200 farklı tümörden hücre hatları oluşturmaya çalışmak için yapılan bir çalışmada izole edilmiştir. İnsan alveoler karsinoma hücrelerinden köken alan A549 akciğer hücreleri, kanser araştırması için bir araç olarak geliştirilmiş olmasına rağmen, insan akciğerinin tip II alveoler hücre fenotipi ile eşleşmekle birlikte, insan primer alveoler epitel hücrelerinin sahip olduğu birçok karakteristiğe de sahiptir. Bu nedenle A549 hücre hattı, yaklaşık kırk yıldır solunum araştırmalarının temelini oluşturmuştur (Giard, 1973; Shapiro vd., 1978; Lieber vd., 1976; Foster vd., 1998; Nardone ve Andrews, 1979).

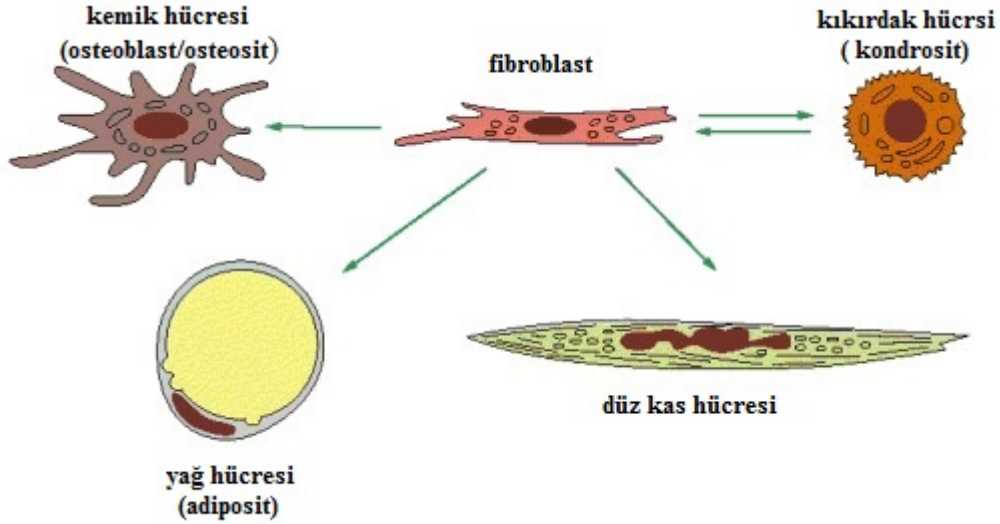
A549 hücre hattı, kanser araştırmaları, distal akciğerin epitelyal modellerinin oluşturulması, solunum yolu hastalıkları ve virolojiye yönelik çalışmalar için; adenovirüsler de dahil olmak üzere birçok insan solunum yolu virüsü için uygun bir konakçıdır (Giard, 1973; Shapiro vd., 1978; Lieber vd., 1976; Foster vd., 1998; Nardone ve Andrews, 1979).

2.2. Fibroblast Hücreleri

Fibroblastlar, bağ dokusunda bulunan en yaygın hücre tipidir. Fibroblastlar mezenkimal hücrelerden köken alır ve çok sayıda sitoplazmik çıkıntıya sahip uzun bir iğ veya yıldız şekline sahiptir (Darby vd., 2014).

Fibroblast, stromada en çok miktarda bulunan hücre tiplerinden biridir. Çeşitli işlevlere sahiptir. Doku ve organlar için temel çerçeveyi oluşturur. Fibroblastlar

homeostazda, ekstraselüler matriksin (ECM) korunmasından sorumludur. Stres sırasında, fibroblastlar çevrelerine uyum sağlar ve yerel sinyalleri yanıtlama ve gönderme yeteneğine sahiptir. Yaralanma zamanlarında, yaralı dokuyu değiştirmek için gerekli yapı taşlarını sentezleyebilir (Dick, 2020). (Şekil 2.7)



Şekil 2.7. Fibroblastlar ve indüksiyon durumunda farklılaşmaları (Alberts vd., 2002)

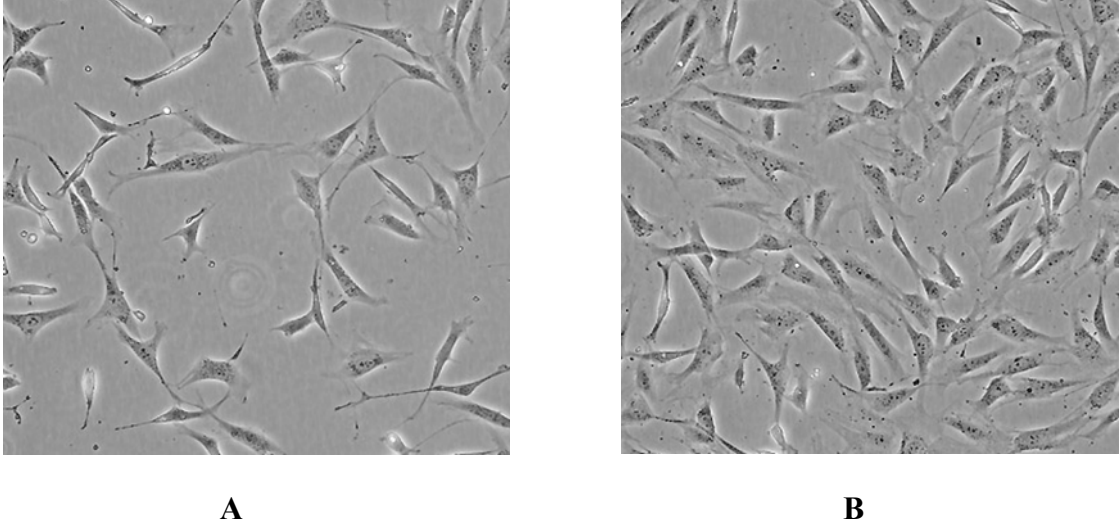
Yetişkin vücutta, uyaranlar protein sentezini ve kasılma mekanizmalarını aktive edene kadar fibroblastlar hareketsiz bir formda kalır. Bu hücreler, cilt, akciğer, kalp, böbrek, karaciğer, göz ve diğer organlarda bulunan ECM'yi yeniden düzenler. ECM çevre hücrelerle sürekli iletişim halindedir, çünkü fibroblastlar hem otokrin hem de parakrin sinyallerini salgılayabilir ve bunlara yanıt verebilir (Darby ve Laverdet, 2014; desJardins-Park vd., 2018)

Fibroblastlar fonksiyonel dokuyu yeniden oluşturabilirler. Yara iyileşmesinin; iltihaplanma, hücre proliferasyonu, ECM birikimi ve yeniden modelleme gibi üç aşamasına da dahil olurlar (Tracy vd., 2016).

2.2.1. NIH/3T3 hücre hattı

3T3 hücre hattı, farelerin fibroblast embriyonik dokularından elde edilmiş, tümöröjenik olmayan bir hücre hattıdır [http-5]. 1962 yılında New York Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda izole edilen bir hücre hattından çoğaltılmıştır [http-6].

En yaygın olarak kullanılan hücre hatlarından biridir. Hücrelerin morfolojisi adhere, fibroblastiktir ve büyümesi nispeten kolay hücre hatları arasında kabul edilir. Ayrıca, 3T3 hücrelerinin iki katına çıkma süreleri 20-26 saattir [http-6].

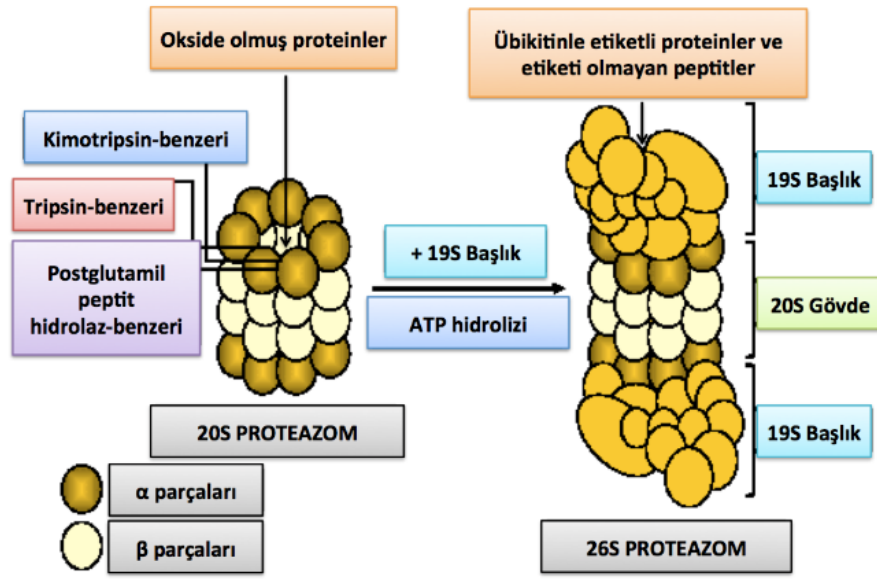


Şekil 2.8. *Düşük yoğunlukta (A) ve yüksek yoğunlukta (B) 3T3 hücreleri [http- 5]*

2.3 Ubiküitin-Proteozom Sistemi

Proteozom, hücre ve organizmanın yaşamı için gerekli olan ve tüm ökaryotlar, arkeobakteriler ve bazı bakterilerde bulunan proteolitik aktiviteye sahip bir komplekstir (Mani ve Gelmann, 2005).

26S Proteozom, yaklaşık 2.5 MDa ağırlığındadır. Silindirik bir 20S proteozom kompleksi ve bunun her iki tarafında yer alan iki adet 19S düzenleyici kompleksten meydana gelmektedir. 20S kompleksinde üç farklı proteolitik aktivite bulunmaktadır. Bunlar kimotripsin benzeri, tripsin benzeri ve peptidilglutamil benzeri hidrolitik aktivitelerdir (Hersko ve Ciechanover, 1998; Voges vd., 1999; Adams, 2004-a). (Şekil 2.9)

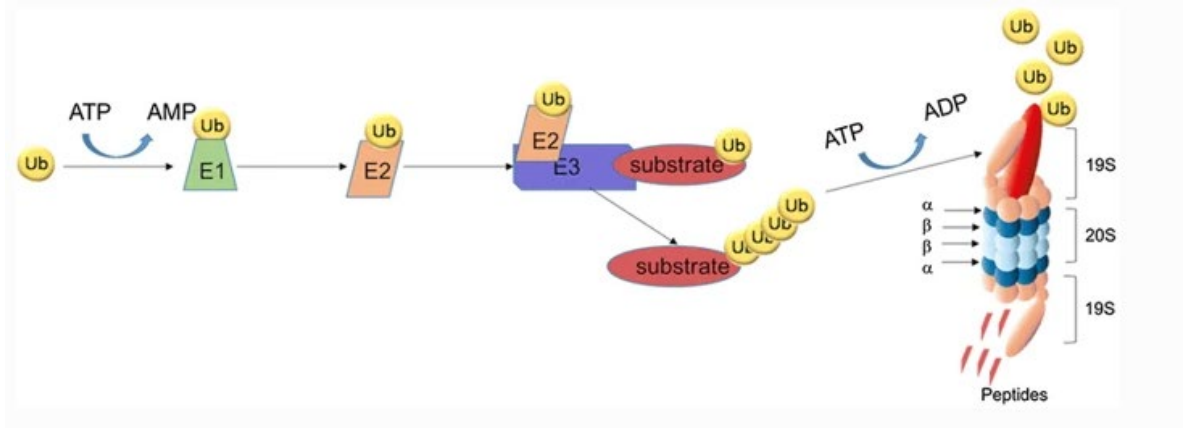


Şekil 2.9. 20S ve 26S proteazomunun şematik gösterimi (Kukan, 2004)

Proteazom, hücre içi homeostaz için çok önemli olan ve hücre içi proteinlerin %80-90'ını parçalamadan sorumlu olan ubiquitin-proteazom sisteminin (UPS) bir parçasıdır (Hochstrasser, 1995; Ri, 2016; Ciechanover, 1994).

Ubikütin-proteazom yolu, tümör hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması için önemli olan birçok işlemin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Proteazom fonksiyonunun inhibisyonu, antikanser tedavi için güçlü bir strateji olarak ortaya çıkmıştır (Manasanch ve Orlowski, 2017).

Normal hücrelerde, düzenli proteinin bozulması UPS için büyük bir yük oluşturur, sentez ve bozulma dengesi artık daha sıkı bir şekilde düzenlenir. UPS bu dengeyi, proteazomun bozulması için bir sinyal görevi gören çoklu ubiquitin parçalarına sahip hasarlı veya yanlış katlanmış proteinleri etiketleyerek kontrol eder. Protein ubiquitinasyonu işlemi, 3 enzimatik basamaktan oluşur; ubiquitin aktive edici enzimler (E1), ubiquitin konjüge edici enzimler (E2) ve ubiquitin E3 ligazları (Şekil 2.10). Protein yıkımı için hedef protein dört veya daha fazla ubiquitin ünitesi ile bağlantılı olmalıdır (Demarchi ve Brancolini, 2005).



Şekil 2.10. Ubikütün-Proteozom sistemi (Demarchi ve Brancolini, 2005)

Ubikütün (Ub) aktive edici E1 enzimi tarafından aktive edilir, daha sonra Ub konjüge edici E2 enzimine aktarılır. Ligaz E3 enzimi, Ub'ı hedef proteine (substrat) bağlar ve daha sonra en az dört Ub kısmı olan bir substrat, parçalanma için proteazom tarafından tanınır. Proteazomun 19S kapağı, Ub kısımlarını çıkarır, daha sonra substrat 20S'de daha küçük peptitlere ayrılır (Demarchi ve Brancolini, 2005).

Yüksek protein döngüsü ve UPS' in kanser hücrelerinin gelişimi, hücre büyümesi ve hayatta kalmasındaki kritik rolü göz önüne alındığında (Adams, 2004-b; Chen vd., 2011), proteazom inhibisyonunun kemoterapötik müdahale için etkili bir hedef olabileceğini göstermiştir (Manasanch ve Orlowski, 2017; Dou ve Li, 1999; Almond ve Cohen, 2002).

2.3.1. Proteozom inhibitörleri

Hücre kültürleri ve fare modelleri kullanılarak yapılan en son deneyler, proteazom inhibitörlerinin hücre proliferasyonunu düşürdüğünü, çoklu mekanizmalar yoluyla solid ve hematolojik malignitelerde apoptozu indüklediğini, bu nedenle tümör büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (Dou ve Li, 1999; Engür vd., 2016). Proteazom inhibitörleri; çeşitli insan tümör hücre hatları test edildiğinde mevcut antikanser ilaçlardan daha fazla apoptozu indükleyen güçte olması, tümörü seçici olarak hedefleme yeteneğinin olması ve sitotoksik tedavilerde tümör hücrelerinin gösterdiği direncin üstesinden gelmesi gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Proteazom inhibitörlerinin bu özelliklere sahip olması, antikanser ajanlar olarak kullanımının etkin olacağını göstermiştir (Dou ve Li, 1999).

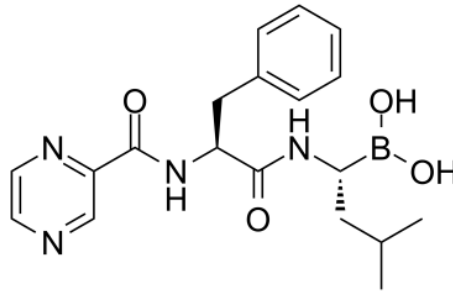
Kanser hastaları ile sağlıklı bireylerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, kanser hastalarının plazmalarında 20S proteozom miktarının sağlıklı bireylere oranla 1000-kat kadar yükseldiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, proteozom inhibitörlerinin spesifik olarak

çoğalabilen hücrelerde apoptoza neden olduklarını ve kanser tedavisinde etkili olabileceklerini düşündürmüştür (Dutaud vd., 2002).

Klinikte birçok proteozom inhibitörünün akciğer, pankreas, meme, tiroid, kolorektal, prostat kanseri gibi yaygın malignitelerdeki etkinlikleri ile ilgili çalışmalar mevcut olup, elde edilen bulgular çeşitli solid malignitelerinde proteozom inhibitörü tedavisinin uygulanabilir olduğunu, ancak her tümör tipi için tam etki mekanizmasını anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerektirdiğini göstermektedir (Roeten vd., 2018).

2.3.1.1. Bortezomib

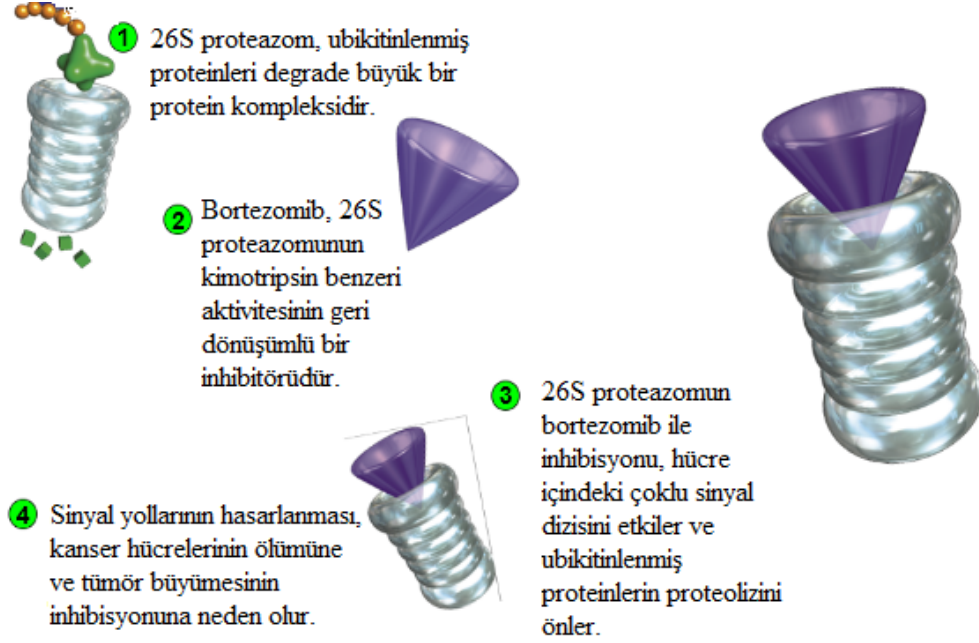
PS-341 ve Velcade olarak bilinen bortezomib, kontrollü bir şekilde protein yıkımını düzenleyerek hücrede önemli rol oynayan bir enzim kompleksi olan 26S proteazomun treonin kalıntısını spesifik ve geri dönüşümlü olarak inhibe eden bir bor içeren moleküldür. NF-kB inhibisyonu, tümör büyümesinin ve sağkalımın önlenmesi, apoptozun indüklenmesi dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler etkilere sahiptir. Multiple myeloma ve manto hücreli lenfoma tedavisinde klinik kullanım için FDA tarafından onaylanan birinci nesil proteazom inhibitör ailesinden gelmektedir (Engür vd., 2016).



Şekil 2.11. Bortezomibin kimyasal yapısı [http-7]

Hücre döngüsü kontrolü, apoptoz ve hücre sinyalleşmesi dahil olmak üzere gerekli olmayan proteinler, onları daha sonra parçalayan proteazoma yönlendiren ubiquitin ile etiketlenir. Bu işlem, hücre döngüsünde yer alan inhibitör ve uyarıcı proteinlerin dengesini korur, böylece proteazomun inhibisyonu, hücre döngüsünün birikmesi ve hücre

ölümüne yol açan düzenleyici proteinler ile işlemin sıkı kontrolünün kaybedilmesine neden olur (Adams, 2004-b). (Şekil 2.12)



Şekil 2.12. Bortezomibin etki mekanizması (Adams, 2003)

Bortezomib, tüm ökaryotik hücrelerde proteazomlar bulunduğundan birçok farklı tümör tipinde kemoterapötik bir ajan olma potansiyele sahiptir. Bununla birlikte multiple myeloma için spesifik etkisi vardır. Ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreas, meme kanserinde de etkili olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Roeten vd., 2018; Karin vd., 2002; Scagliotti, 2006; Richardson vd., 2007; Kumar vd., 2011; Papandreou ve Logothetis, 2004; Yang vd., 2008).

Ando vd. (2014) yaptığı bir çalışmada; A549 akciğer kanseri hücre hattında, 80 nM bortezomib ile CID (kimyasal indüklü dimerizasyon) kombin uygulanması sonucunda sinerjistik bir etki oluşturduğu belirlenmiştir (Ando vd., 2014).

Yapılan başka bir çalışmada 5, 10, 20 nM bortezomibin Colo320HSR, HT 29 ve DLD1 kolon kanseri hücre hatları ile 24 saatlik inkübasyonu sonunda, hücre proliferasyonlarının anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bu etkinin bortezomibin proteazom inhibisyonundan kaynaklanan hücre içi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretiminin artmasıyla ilişkili olarak hücre döngüsünü durdurarak antikanser aktivite gösterdiğini açıklanmıştır (Hong vd., 2012).

Engür ve Dikmen (2017) tarafından yapılan bir çalışmada MLN2238 ve bortezomib'in insan kolon adenokarsinom Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bortezomib ve MLN2238, Caco-2 hücreleri üzerinde zaman ve konsantrasyona bağlı önemli antiproliferatif ve apoptotik etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Engür ve Dikmen, 2017).

Bir başka çalışmada bortezomibin sağlıklı insan deri fibroblast hücre hattının (CRL1474) canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bortezomibin hücre proliferasyonuna olan etkileri, artan bortezomib konsantrasyonlarıyla 12 saat, 24 saat ve 48 saat için MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. 25 nM ile 1000 nM arasında bortezomibin hücrelerin canlılığında zamana ve doza bağlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. 1000 nM bortezomibinin hücre canlılığını önemli oranda azalttığı görülmüştür (Kretowski vd., 2014).

2.4. Fenolik Bileşikler ve Kanser İlişkisi

Fenolik maddeler aromatik halkasında bir ya da daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Shahidi ve Nacz, 1995; Chirinos vd., 2009).

Fenolikler, meyveler, sebzeler, tahıllar ve baklagillerde sıklıkla bulunan hayati bileşenlerdir (Rosa vd., 2016).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, fenolik bileşiklerin, antienflamatuar, antiaterosklerotik, antitümör, antimutajenik, antikarsinojenik, antibakteriyel ve antiviral aktiviteler gibi önemli biyolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Halliwell, 1994; Sala, 2002; Cai, 2004)

Fenolik bileşikler, bitkilerde pigmentasyon, büyüme, üreme ve patojenlere veya yırtıcılara karşı direnç gibi çok çeşitli süreçlerde işlev görürler. Kumarinler, flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve tanenler olmak üzere beş ana sınıfa ayrılırlar (Ls ve Nja, 2016; Anantharaju, 2016).

Fenolik bileşikler, bitkisel kaynaklı maddelerin en çok çalışılan grubunu oluşturmaktadır (Aydın ve Üstün, 2007). Fenolik asitler, stilbenler ve flavonoidler en çok çalışılmış bileşik gruplarıdır. Bunlardan özellikle fenolik asitler ve flavonoidler antioksidanlar olarak önemli özelliklere sahiptir (Güleşçi ve Aygöl, 2016).

Ferulik, kafeik ve ellajik asitler doğal olarak oluşan bitki fenolleridir (Wood, 1982). Doğal fenolik bileşikler, kanseri önleme ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır (Huang, 2009).

İyileşme süresini azaltmak ve kemoterapötiklerin etkinliğini potansiyel olarak arttırmak için, kanser tedavisinde zararlı maddelerin ortadan kaldırılması önemlidir. Doğal ürünlerin kanser önleyici ve antikanser etkileri, epidemiyolojik, hücre kültürü ve hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlarla geniş ölçüde desteklenmektedir (Landis-Piwowar vd., 2006; Huang vd., 2009).

Yapılan çalışmalar fenolik bileşiklerin özellikle antikarsinojen aktiviteleri olduğunu açıklamaktadır. Fenolik bileşikler karsinojenik kimyasal maddelerin yan etkilerini; karsinojenleri detoksifiye ederek, karsinojenlerin alınımını inhibe ederek, aktivasyonlarını ve yapılarını bozarak, DNA'ya bağlanmasını önleyerek ve DNA tamir mekanizmasının etkisini artırarak önlemektedirler (Ramos vd., 2011). Özellikle antikanserojen etkilerinin, kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etme yetenekleri ile de ilişkili olduğu açıklanmıştır (Srinivasulu vd., 2018; Ls ve Nja, 2016).

2.4.1. Fenolik asitler

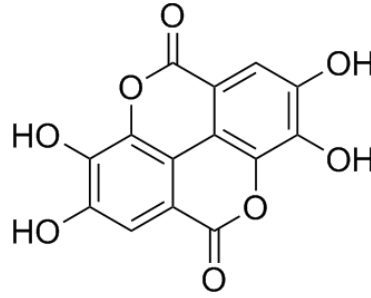
Fenolik asitler, birçoğu diyetle günlük olarak tüketilip, birçok kanser tedavisi için ana kaynak olmuştur. Çeşitli kanserlere ve diğer birçok hastalığa karşı önemli koruma sağlarlar. Fenolik asitler antioksidan özellikleri sayesinde, hücreleri hasardan koruyarak kanserden ve diğer hastalıklardan korurlar (Ls ve Nja, 2016; Chander, 2018).

Yapılan birçok çalışmada sunulan veriler fenolik asitlerin hücre canlılığını azaltmada, hücre döngüsünü modüle etmede ve apoptoz indüksiyonu ile tümör ilerlemesini kontrol etmede önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Rosa vd., 2018).

Çeşitli çalışmalarda fenolik asitlerin antikanser özellikleri bildirilmiş olmasına rağmen, bazılarının mekanizmaları hala tam olarak belirlenememiştir. Ancak fenolik asitlerin, serbest radikalleri azaltmak, ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin indüksiyonu arttırmak, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücrel sinyal yollarının modülasyonu gibi temel rolleri olduğu açıklanmıştır (Rosa vd., 2016).

2.4.1.1. Ellajik asit

Ellajik asit, bitkilerde bulunan doğal bir fenolik asittir. Ellajik asit, lipofilik alanı gösteren dört halka, hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton grubu ile termodinamik açıdan oldukça kararlı bir moleküldür (Hurley, 1998). (Şekil 2.13)



Şekil 2.13. Ellajik asitin kimyasal yapısı [http-8]

Ellajik asit; suda az çözündüğü halde metanolde, etanolde ve dimetil sülfoksitte iyi çözünmektedir (Aguilera-Carbo vd., 2008).

Ellajik asit, jaboticaba, ceviz, myrobalan, büyük burnet, nar gibi çeşitli bitkilerin yapraklarından, meyvelerinden ve tohumlarından elde edilir. Ellajik asit, ellajitaninlerin sekonder metabolitlerinin hidrolizi ile oluşturulabilir. Ellajik asidin birçok kanser hücrelerinde antienflamatuar ve antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir. Birçok çalışma bitkilerin ellajik asit özütlerinin farklı kanser türlerindeki hücreler üzerinde büyümeyi baskılayan bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Çağlar vd., 2017).

Yapılan birçok çalışmada ellajik asidin antioksidan, antikanserojenik, antiöstrojenik, antiperoksidatif, antiviral ve antimutajenik etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir (Aguilera-Carbo vd., 2008; Olsson vd., 2004; Notka vd., 2004; Pinto vd., 2008)

Ellajik asitin, bir dizi farklı mekanizmalarla çeşitli kanserojen kaynaklı tümör insidansını azalttığı gösterilen birçok çalışmalar mevcuttur. (Lesca, 1983; Mukhtar vd., 1984; Chang vd., 1985; Mukhtar vd., 1986; Mandal ve Stoner, 1990).

Ellajik asit, hücre döngüsünü durdurarak, tümör hücresi proliferasyonunu inhibe ederek, hücre apoptozunu indükleyerek, enflamasyonu iyileştirerek ve anjiyogenezi

inhibe ederek *in vitro* ve *in vivo* antikanser aktiviteler göstermiştir (Duan vd., 2019). Ellajik asitin detoksifikasyon enzimleri olarakta bilinen Faz II enzimlerini indükleyip kanserojen maddelerin barsakta emilimini inhibe ettiği de bildirilmiştir (Watzl ve Leitzmann, 2005).

Bir çalışmada ellajik asitin; prokanserojenlerin aktivasyonunu katalize eden Faz I enzimlerini de inhibe ettiği bildirilmiştir (Waladkhani ve Clemens, 2001). Örneğin; Ellajik asit, benzo [a] pirenin CYP1A'ya bağımlı aktivasyonunu inhibe ederek polisiklik aromatik hidrokarbon kaynaklı tümör oluşumunu engeller (Shugart ve Kao, 1984). Buna ek olarak, ellajik asidin DNA'ya bağlandığı ve kanserojenlerin metilasyonu ile metilguanin oluşumunu engellediği gösterilmiştir. (Dixit ve Gold, 1986; Barch ve Fox, 1988).

Ellajik asitin DNA'yı modifiye eden birkaç enzimi (topoizomera I-II, giraz ve polimeraz) inhibe ettiği ve bu şekilde kanser hücrelerinin büyümesini önlediği rapor edilmiştir (Thulstrup vd., 1999). Ayrıca ellajik asitin antikanserojen etkisiyle ilgili yapılan bir araştırmada ellajik asit ile DNA arasında kovalent bağlarının olduğu görülmüş ve bu sayede DNA'nın, kanserojen madde ile bağlanmasının engellendiği gösterilmiştir (Huetz vd., 2005).

Ellajik asitin, kolon, prostat, meme, rahim ağzı ve pankreas kanseri hücreleri üzerine antitümör etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Papoutsis vd., 2005; Mokhtar vd., 2009).

Kanserojen olarak etki gösteren polisiklik aromatik hidrokarbonların bu etkilerini fenolik asitlerle inhibe etmenin araştırıldığı bir çalışmada ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit ve ellajik asitin etkileri karşılaştırıldığında en yüksek antikanser aktiviteyi ellajik asit göstermiştir (Watzl, 2005).

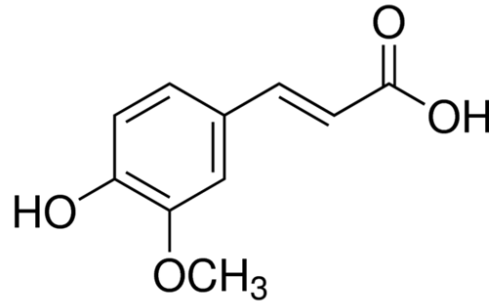
Yapılan bir çalışmada; ellajik asitin insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri A549 hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda ellajik asitin, PI3K/AKT sinyal yolunun baskılanması yoluyla insan A549 hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskılayabileceği, hücre döngüsünü durdurabileceği ve apoptozu indükleyebileceği gösterilmiştir. Elde edilen bu bulgular, ellajik asitin akciğer kanseri tedavisi için potansiyel bir tedavi olarak geliştirebileceğini göstermiştir (Liu vd., 2018)

Yapılan başka bir çalışmada da ellajik asitin düşük konsantrasyonlarda A549 kanser hücre hattı üzerinde anlamlı bir sitotoksitesi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ellajik asitin yüksek sitotoksik aktiviteye neden olduğu ve A549 hücrelerinde apoptozu

tetiklediği gösterilmiştir. Sonuç olarak ellajik asitin, kanser tedavisinde alternatif bir madde olarak *in vitro* ve *in vivo* kanser modellerinde ileri düzey araştırmaları devam etmektedir (mleki vd., 2019).

2.4.1.2. Ferulik asit

Ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit, FA) (şekil 2.14) bitkilerde en fazla bulunan fenolik asitlerden biridir. Buğday, pirinç, mısır, yulaf, avdar, portakal ve arpada bulunan fenilalanin ve tirozinin metabolize edilmesinden elde edilen bir yan üründür (Ls ve Nja, 2016).



şekil 2.14. Ferulik asit kimyasal yapısı [<http-9>]

Kanser, nörodejeneratif, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalıklarda ferulik asitin çok çeşitli terapötik etkileri olduğu gösterilmiştir (Zhou vd., 2016).

Ferulik asitin antioksidasyon, antiateroskleroz, antienflamasyon, antikoagülasyon, detoksifikasyon, hepato-koruma ve bağışıklık düzenleme gibi çok çeşitli farmakolojik aktiviteleri olduğu açıklanmıştır (Yue vd., 2019).

Ferulik asit düşük toksisiteye sahip olması ve doğada yaygın olarak mevcut olması nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Son zamanlarda ferulik asitin önemli antikanser aktivitelerine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Kampa vd., 2004; Lee, 2005).

Ferulik asitler aynı zamanda tümör gelişimi üzerinde inhibe edici etkiler sergilerler ve nitrozaminler gibi mutajenik bileşiklerin oluşumunu engelleyebilirler (Andreasen vd., 2001).

Yapılan birtakım çalışmalarda ferulik asitin Caco-2 hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki antiproliferatif etkisi olduğu görülmüştür. Bu etkiyi, S/G2 fazını uzatıp ve G1 fazını azaltarak gösterdiği belirlenmiştir (Janicke vd., 2011).

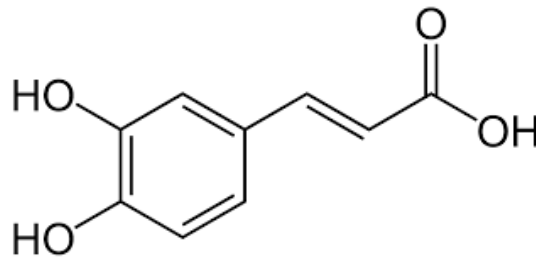
Yapılan başka bir çalışma sonucunda kafeik asit ve ferulik asitin, tümör ilerlemesinin adezyon ve migrasyon adımlarında, akciğer ve kolon kanseri gelişimine karşı antikanser ajanlarla aktif maddeler olarak katılabileceğini göstermiştir (Bouzaiene vd., 2015).

Kemoterapötik ajanların toksik olduğu ve ciddi yan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Doğal ürünler, tedavide kullanılan ajanlarla sinerjistik bir etki gösterebilir ve bu yan etkileri azaltabilir. Yapılan bir çalışmada, ilk kez standart tedavide kullanılan bir ajan olan gemitabin ile ferulik asit kombinasyonunun prostat kanseri hücrelerinde bu süreçlerle ilişkili genleri düzenleyerek sinerjik olarak apoptozu arttırdığı ve metastazı inhibe ettiği görülmüştür. Böylece ferulik asitin kombinasyon tedavilerinin etkili bir parçası olabileceğini göstermektedir (Eroglu vd., 2018).

2.4.1.3. Kafeik asit

Kafeik asit (3,4-dihidroksisinnamik asit) (Şekil 2.15), fenolik propolis ekstraktında ve ayrıca çok çeşitli bitkilerde bulunan aktif bir bileşendir (Onori vd., 2009). Kafeik asit buğday, arpa, mısır, yulaf, çavdar, pirinç, kekik ve adaçayında ester formu olarak bulunur. (Ls ve Nja, 2016; Srinivasulu vd., 2018).

Yapılan birtakım çalışmalar kafeik asitin antienflamatuar, antimutajenik, antibakteriyel ve antikanserojen özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Genaro-Mattos, 2015; Chen vd., 1995; Yamada ve Tomita; 1996; Ani vd., 2006; Kang vd., 2009).



Şekil 2.15. Kafeik asit kimyasal yapısı [http-10]

Son alışmalar kafeik asitin, *in vitro* araştırmalarda ve hayvan modellerinde çeşitli farmakolojik etkileri olduğu ve hücre döngüsü inhibisyonu ve proapoptotik etki ile güçlü kemopreventif etkileri olan bileşik olduğu açıklanmıştır (Kampa vd., 2004; Kabala-Dzik vd., 2017; Dziedzic vd., 2017; Sun vd., 2017; Lin vd., 2012; Jaganthan, 2012; Orsolice vd., 2005; Yang vd., 2014).

Kafeik asitin ayrıca, insan akciğer A549 ve kolon adenokarsinomu HT29-D4 hücrelerinde hücre dışı matrise bağlanmasını azaltarak, ROS-SOD üretimini baskılayarak, kanserin ilerlemesi ve migrasyonu önlenmesi yoluyla önemli antioksidan etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Anantharaju vd., 2016; Nasr Bouzaiane vd., 2015).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Bortezomib (BioChemica - A7737, Almanya)
Caco-2 Hücre Hattı (ATCC kodu: HTB-37™, Amerika Birleşik Devletleri)
NIH/3T3 Hücre Hattı (ATCC kodu: CRL-1658, Amerika Birleşik Devletleri)
Kafeik Asit (Sigma-Aldrich, C0625, Almanya)
Ferulik Asit (Sigma-Aldrich, Y0001013, Almanya)
Ellajik Asit (Sigma-Aldrich, E2250, Almanya)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, D 5671, Almanya)
RPMI-1640 medyum (1X) (HyClone, Thermo Scientific, Almanya)
Penisilin/Streptomisin (Gibco, Amerika Birleşik Devletleri)
12 kanallı otomatik pipet (Axygen, İngiltere Birleşik Krallığı)
Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya)
Tripan mavisi (Roche, Almanya)
Kryotüp (2ml) (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen, Almanya)
MTT (Sigma-Aldrich, Almanya)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Almanya)
xCELLigence E-plate 96 (Roche, Almanya)
0,2 ml'lik PZR tüpü (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipetör (Eppendorf, Kanada),
10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)
25 cm²-75 cm²'lik hücre kültür flaskı (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
2ml'lik Eppendorf tüp (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
16 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre)
Cedex smart Slide (Roche, Almanya)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)
Lamel (Isolab, Almanya)
Trypsin-EDTA 10X (Pan, Biotch, Almanya)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cedex (Innovatis, Almanya)

Derin dondurucu buzdolabı (Altus, Türkiye)

Hassas terazi (Ohaus, Avustralya)

Laminar Flow kabin (Heal Force, Çin Halk Cumhuriyeti)

Masaüstü soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Mikro santrifüj (Hettich, Almanya)

HERAcell 150 Steril CO2 inkübatörü (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

Su banyosu (Nüve, Türkiye)

Inverted mikroskop (Leica, Almanya)

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

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) (Roche, Almanya)

Otoklav (Alp, Türkiye)

Sterilizatör (Nüve, Türkiye)

4. YÖNTEMLER

4.1. Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde akciğer kanseri (A549) ve kolon kanseri (Caco-2) olmak üzere iki farklı kanser hücre hattı ve sağlıklı bir hücre hattı olan fare embriyonik fibroblast hücreleri (3T3) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Caco-2, A549 ve 3T3 hücreleri daha önceden Amerikan Tissue Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiş olan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Laboratuvarının hücre kültürü stoklarından kullanılmıştır.

4.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

4.2.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı şekilde sterilizatörde kuru ısı ile 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise otoklavda 121°C, 1.5 atm/Hg'de 20 dakika steril edilmiştir.

4.2.2. Ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bortezomib konsantrasyonlarının hazırlanması

Moleküler ağırlıkları bilinen toz halindeki ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bortezomibin belirli hacimlerde dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stokları hazırlanmıştır. Bu stok solüsyonlardan, her deney öncesinde taze besiyeriyle seyreltme işlemleri yapılarak farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kontrol grubuna medyum içinde %0.1 oranında DMSO eklenerek uygulanmıştır.

4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1. Stoktan hücre çıkarma

Çalışmamızda Caco-2 A549 ve 3T3 hücre hatları stoklarımızdan kullanılmıştır. Hücreler kültür koleksiyonundan alındığında donmuş halde bulunmaktadır. Dondurulmuş halde bulunan hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosunda hızlı bir şekilde cryo tüpün içine su girmeyecek şekilde bekletilerek çözülmesi sağlanmıştır.

Hücreler tamamen çözüldükten sonra %10 Fötal Sığır Serum, %1 Penisilin-Streptomisin içeren besiyerine aktararak, 5 dk. boyunca 1250 RPM (Revolutions Per Minute)'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bittikten sonra steril kabin içine alınıp

tüpündeki medyum uzaklaştırılmıştır. A549 ve Caco-2 hücreleri %10 fetal sığır serumu, %1 penisillin-streptomisin içeren RPMI besiyerinde, NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast normal hücre hattı da %10'luk fetal sığır serumu ve %1 penisillin-streptomisin içeren DMEM (%1 L-glutamin, %1 sodyum pirüvat içeren) besiyerinde %5 CO₂'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.

4.3.1.1. Hücre sayımları

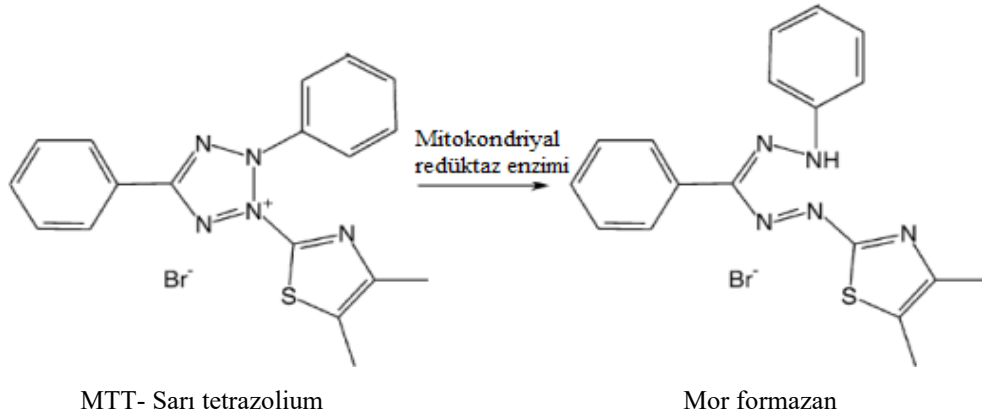
Deneylerimizde kullanılan hücreler, yetiştirildikleri flasklarda yeterli yoğunluğa ulaştıklarında belirli aralıklarla pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasajlanacak olan hücreler mikroskopta bakıldıktan sonra steril kabinin içine alınmıştır. Flaskın üstündeki medyum pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırılmıştır. Sonra PBS'den 5 ml flaska konulup ve ağzı kapatılarak flask nazikçe sağa sola hareket ettirilmiş ve bu şekilde hücreler yıkanmıştır. Daha sonra PBS atılmış ve flaska 2 ml tripsin konmuş, 3-5 dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri ilave edilerek pipetaj yapılmıştır. Besiyeri-hücre karışımı falkon tüpüne alınıp 1250 RPM' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp hücre pelleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilip tekrar pipetaj yapılmıştır. Hücre süspansiyonundan 10 µL pipet yardımıyla alınarak bir lamel üzerinde 10 µl Tripan mavisi ile karıştırılıp Cedex Smart Slide'a aktarılmış ve Cedex XS cihazı ile 1ml'deki hücre sayısı belirlenmiştir.

4.3.2. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Bortezomib, ellajik asit, kafeik asit ve ferulik asitin kullanılan hücre hatları üzerindeki konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemiyle belirlenmiştir (Denizot ve Lang, 1986).

Bu yöntem canlı hücrelerdeki mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanır. Bu yöntemde, sarı renkli ve suda çözünmeyen tetrazolium tuzu (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür, MTT), canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve canlı hücrelerde aktive olan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen

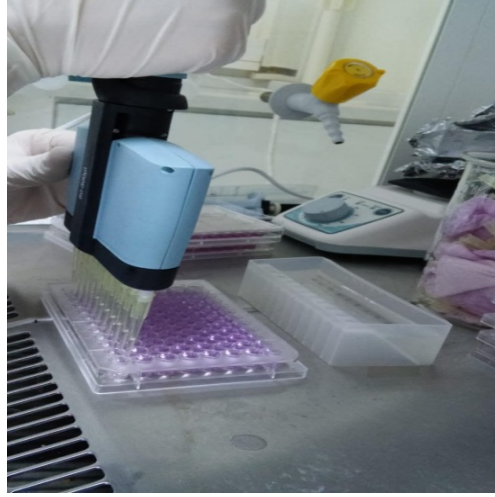
formazana indirgenir (Şekil 4.1). Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülür. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilip, spektrofotometrik olarak belirlenen değerler canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Denizot ve Lang, 1986; Horakova vd., 2001).



Şekil 4.1. Tetrazoliumun mitokondriyal redüktaz enzimleri aracılığıyla formazan tuzuna indirgenmesi (Ganot vd., 2013)

4.3.2.1. Yöntemin uygulanması

3T3, Caco-2, A549 hücreleri uygun besiyeri ortamında 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücreler her bir kuyucukta 5x10³ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve hücrelerin plakaya yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyumlar uzaklaştırılmış ve borteomib, ellajik asit, borteomib + ellajik asit, ferulik asit, borteomib + ferulik asit, kafeik asit, borteomib + kafeik asitin medyum içinde hazırlanan 25, 12.5, 6.25, 3.125 µM konsantrasyonları hücrelere uygulanmıştır (Şekil 4.2). Kontrol olarak da besiyeri içinde %0.1’lük DMSO kullanılmıştır. Hücreler tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 4.2. *Hücre plaklarına MTT nin uygulanması*

Steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan (5 mg/mL), MTT çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Plakalardaki besiyeri atılmış ve her bir kuyucuğa taze besiyerinde hazırlanmış MTT çalışma solüsyonundan 100 μ L eklendikten sonra, hücreler 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda MTT içeren besiyerleri atılarak, her kuyucuğa çözücü olarak 100 μ L DMSO pipetlenmiştir. Plakalar, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader’da 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri, her bir konsantrasyon için 8 tekrar (8 kuyucuk) olacak şekilde okunmuştur. Kontrol kuyularının absorbans değerleri ortalaması %100 kabul edilmiş ve maddelerin uygulandığı konsantrasyonların % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

4.3.3.Kombine konsantrasyonların sinerjistik sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

Bortezomib ile ellajik asit, bortezomib ile ferulik asit ve bortezomib ile kafeik asit arasındaki sinerjistik / antagonistik etkileşimler MTT analizi ile araştırılmıştır. 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M konsantrasyonlarda bortezomib ile ellajik asit, bortezomib ile ferulik asit ve bortezomib ile kafeik asit 24 saat boyunca 1:1 oranında 3T3, A549, Caco-2 hücre hatlarına kombine olarak uygulanmıştır. Etkiler MTT yöntemi ile belirlenmiştir. MTT sonuçlarına göre elde edilen % hücre canlılık değerleri kullanılarak CDI hesaplanmış, sinerjistik ve antagonistik etkiler değerlendirilmiştir (Yildiz-Ozer vd., 2018; Zhou vd., 2012).

4.3.3.1. İlaç etkileşim katsayısı (CDI) hesaplama

İlaç etkileşiminin katsayısı (CDI) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Daphu vd., 2014).

$$CDI = [AB / (A \times B)] \times 100 \quad (4.1)$$

AB = kombine uygulanan grubun % hücre canlılığı

A ve B = tek madde için % hücre canlılığı

CDI < 1 sinerjizmi, CDI < 0.7 güçlü sinerjizmi, CDI = 1 additifliği ve CDI > 1 antagonizmi gösterir (Lopez-Acevedo vd., 2014).

4.3.4. İstatistiksel analiz

Deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı denenmiş ve her deney de kendi içinde 7 tekrarlı çalışılmıştır.

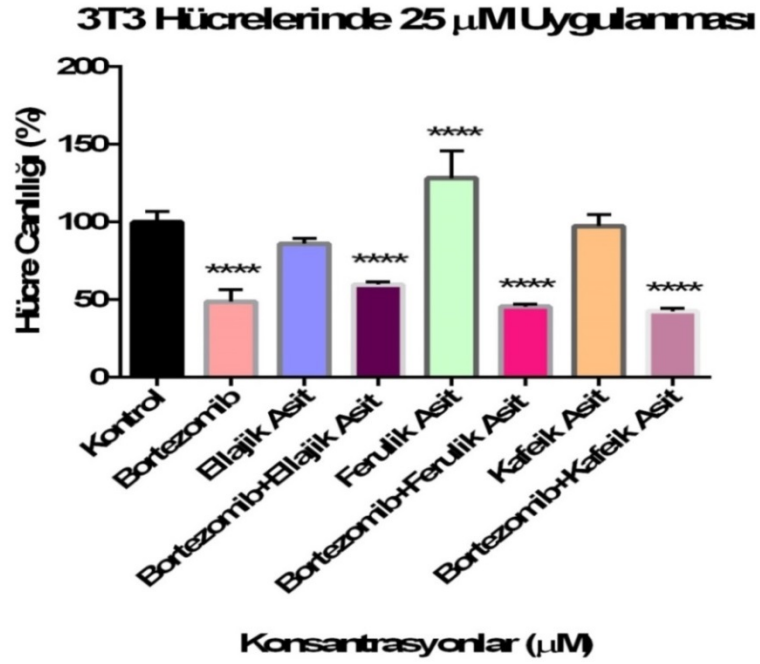
MTT sonuçlarına göre hesaplanan % hücre canlılık değerleri kullanılarak, ortalama $\pm$ standart sapma değerlerine göre grafikler çizilmiştir. GraphPad Prism 8’de tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel yönden anlamlılıklar belirlenmiştir. Anlamlılık değerleri; $p > 0.05$ fark yok, $*p < 0.05$ fark var, $**p < 0.01$ anlamlı fark var, $***p < 0.001$ önemli derecede fark var, $****p < 0.0001$ çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Bortezomib, Ellajik asit, Ferulik asit, Kafeik asit ve Bortezomibin Bu Fenolik Asitlerle Kombinasyonlarının 3T3 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

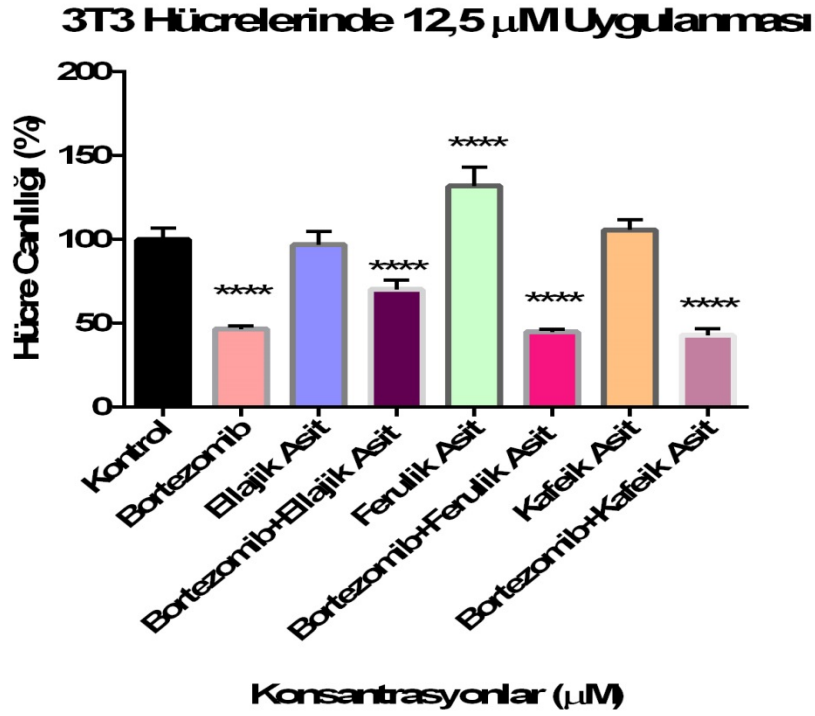
3T3 hücrelerinde bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asitin 25, 12.5 μ M, 6.25 μ M ve 3.125 μ M konsantrasyonlarının tekli uygulamaları ve bortezomib ile ellajik asit, ferulik asit, kafeik asitin kombin uygulamalarının % hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 5.1- Şekil 5.4 te verilmiştir.

MTT sonuçlarına göre, 3T3 hücrelerine 25 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (25 μ M + 25 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %48.68, 86.06, 59.8, 128.3, 45.63, 97.35 ve 42.59 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre % hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, bortezomib + ellajik asit, ferulik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için **** $p < 0.0001$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.1).



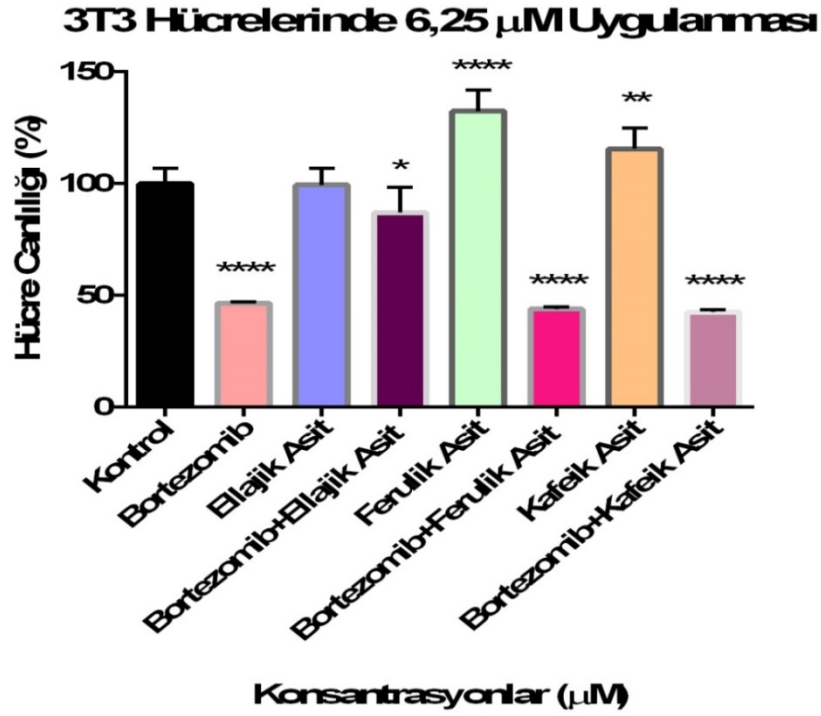
Şekil 5.1. 3T3 hücrelerinde 25 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$, **** $p < 0.0001$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarına göre, 3T3 hücrelerine 12.5 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (12.5 μ M + 12.5 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %46.52, 96.96, 70.32, 132.0, 44.95, 105.7 ve 42.84 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre % hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, bortezomib + ellajik asit, ferulik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için **** $p < 0.0001$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.2).



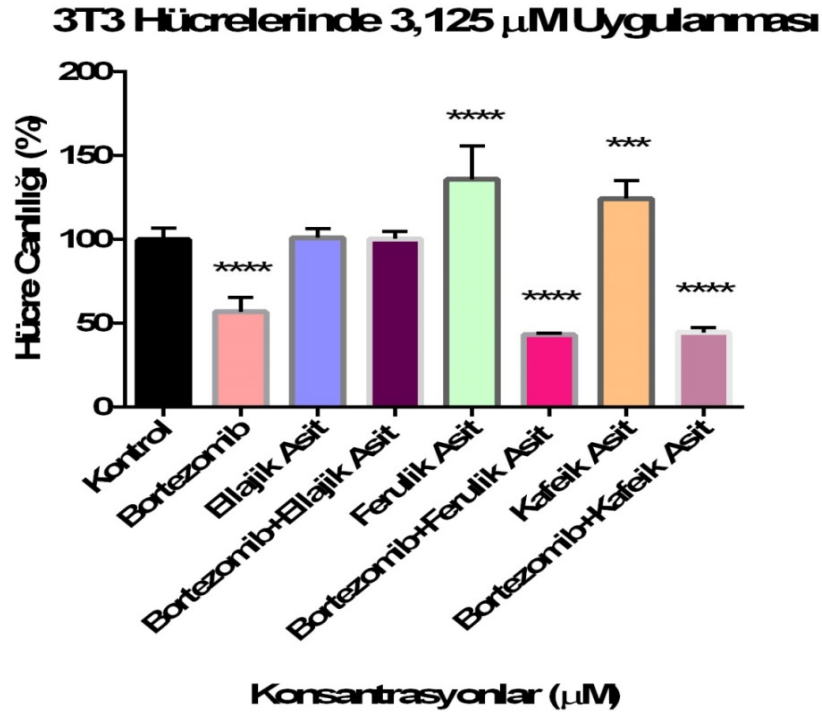
Şekil 5.2. 3T3 hücrelerinde 12.5 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$, **** $p < 0.0001$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarına göre, 3T3 hücrelerine 6.25 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (6.25 μ M + 6.25 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %46.58, 99.41, 87.01, 132.5, 43.89, 115.59 ve 42.59 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre ferulik asit ve kafeik asitte % hücre canlılık oranları artmış olup istatistiksel olarak sırasıyla $p < 0.0001$ ve $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir. Bortezomib, bortezomib + ferulik asit, ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonlarında kontrole göre % hücre canlılık oranları azalmış olup istatistiksel olarak $p < 0.0001$; bortezomib + ellajik asit için de $p < 0.05$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. 3T3 hücrelerinde 6.25 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$, **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

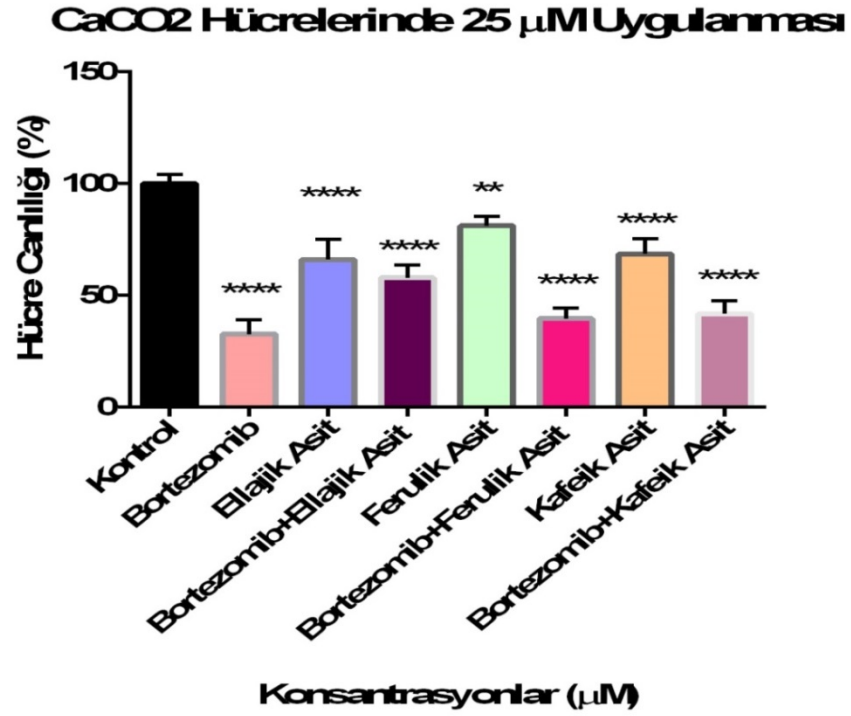
MTT sonuçlarına göre, 3T3 hücrelerine 3.125 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (3.125 μ M + 3.125 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %56.92, 101.12, 100.49, 135.82, 43.18, 124.44 ve 44.65 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre % hücre canlılık oranları kontrole göre ferulik ve kafeik asit gruplarında artmıştır ($p < 0.0001$ ve $p < 0.001$). Bortezomib, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyonlarında ise kontrole göre hücre canlılığı azalmış ve istatistiksel olarak anlamlılık $p < 0.0001$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. 3T3 hücrelerinde 3.125 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

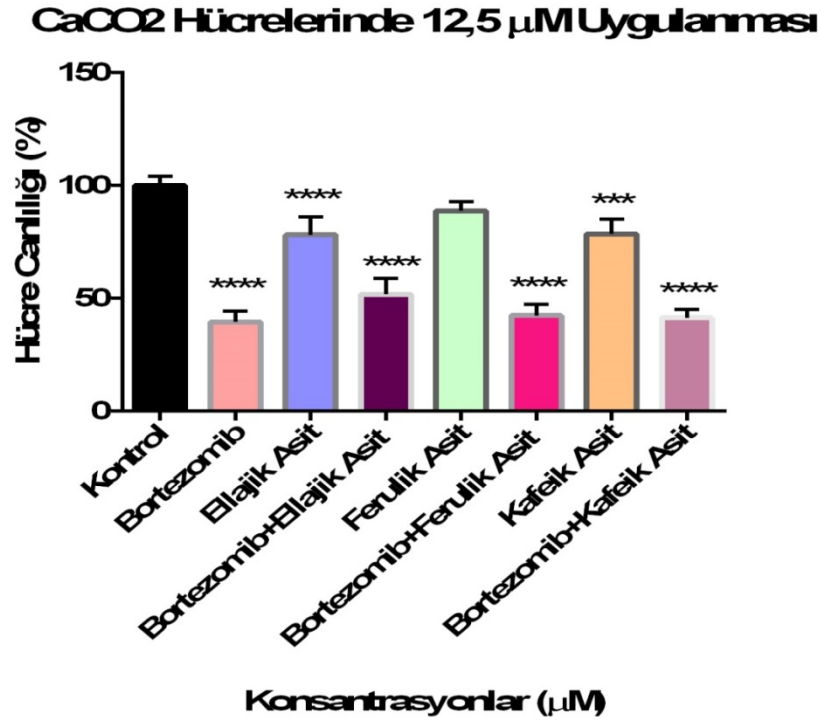
5.2. Bortezomib, Ellajik asit, Ferulik asit, Kafeik asit ve Bortezomibin Bu Fenolik Asitlerle Kombinasyonlarının Caco-2 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

MTT sonuçlarına göre, Caco-2 hücrelerine 25 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (25 μ M + 25 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %32.71, 66.07, 57.96, 81.25, 39.67 , 68.59 ve 41.81 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, ellajik asit, bortezomib + ellajik asit , bortezomib + ferulik asit, kafeik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için $p < 0.0001$; ferulik asit için de $p < 0.01$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.5).



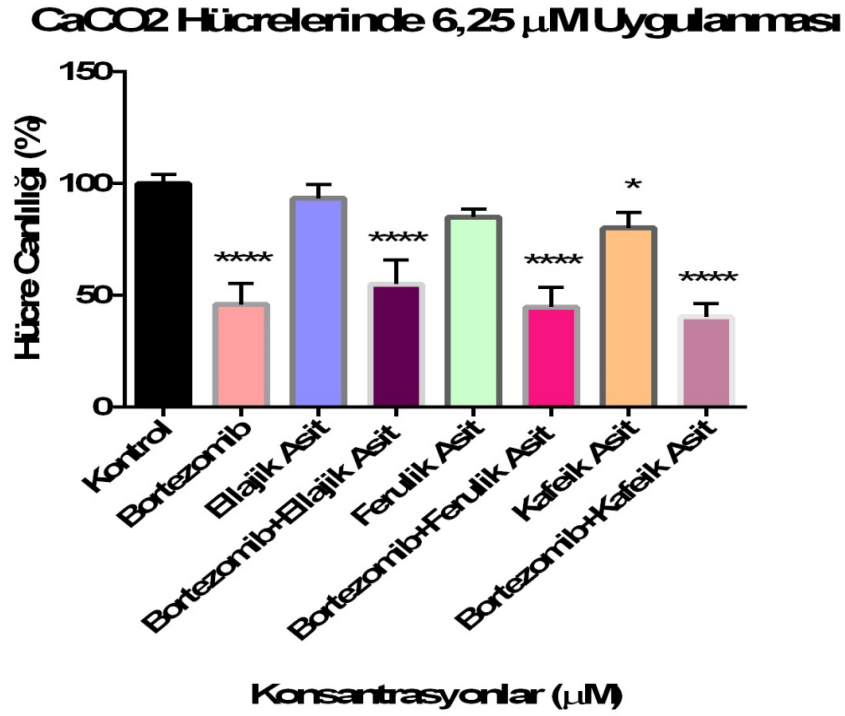
Şekil 5.5. *Caco-2* hücrelerinde 25 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$, **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarına göre, Caco-2 hücrelerine 12.5 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (12.5 μ M + 12.5 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %39.62, 78.18, 51.82, 88.86, 42.48, 78.53 ve 41.48 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, ellajik asit, bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için $p < 0.0001$; kafeik asit için $p < 0.001$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. *Caco-2* hücrelerinde 12.5 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

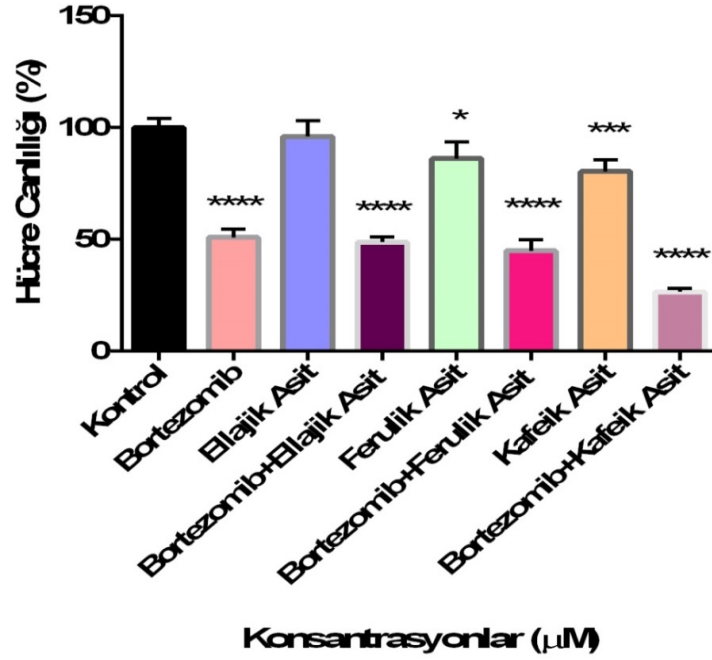
MTT sonuçlarına göre, *Caco-2* hücrelerine 6.25 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (6.25 μ M + 6.25 μ M), gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %45.91, 93.45, 55.09, 85.02, 44.82, 80.23 ve 40.38 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için $p < 0.0001$; kafeik asit için $p < 0.05$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.7)



Şekil 5.7. *Caco-2* hücrelerinde 6.25 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama ± standart sapma), n=7, **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarına göre, *Caco-2* hücrelerine 3.125 µM konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (3.125µM + 3.125µM) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %50.96, 96.12, 48.80, 86.21, 44.94, 80.46 ve 26.56 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranlarının azalması istatistiksel olarak bortezomib, bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için $p < 0.0001$; kafeik asit için $p < 0.001$; ferulik asit için $p < 0.05$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.8).

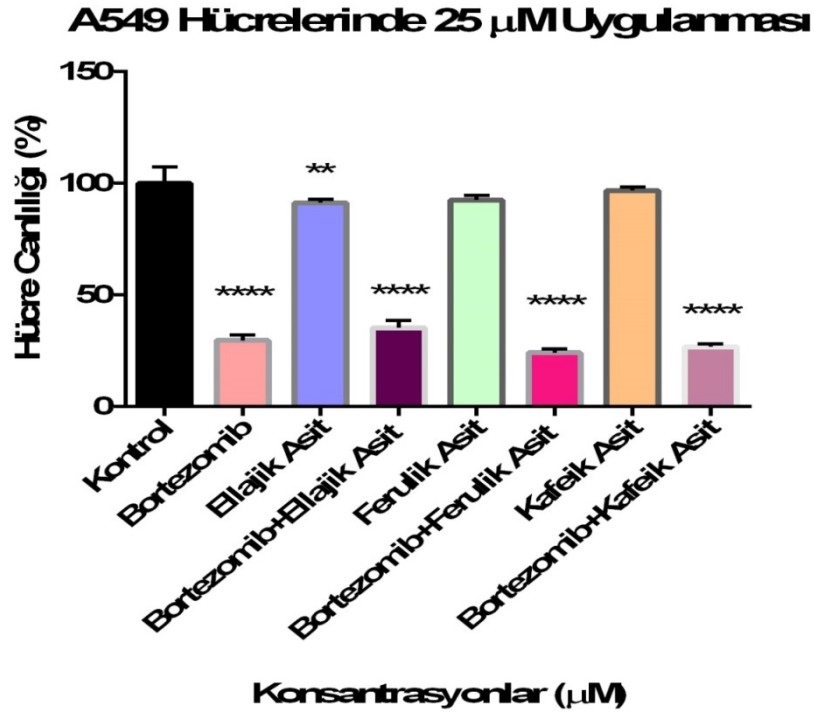
CaCO₂ Hücrelerinde 3,125 µM Uygulanması



Şekil 5.8. Caco-2 hücrelerinde 3.125 µM konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama ± standart sapma), n=7, ****p < 0.0001, ***p < 0.001 *p < 0.05, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: % 0.1 DMSO)

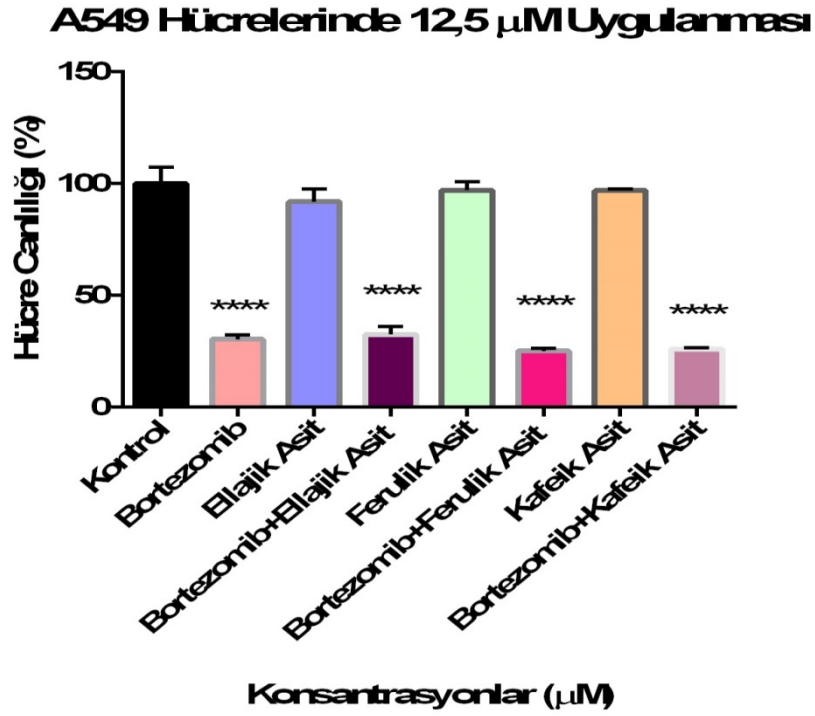
5.3. Bortezomib, Ellajik asit, Ferulik asit, Kafeik asit ve Bortezomibin Bu Fenolik Asitlerle Kombinasyonlarının A549 Hücrelerinde 24. Saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

MTT sonuçlarına göre, A549 hücrelerine 25 µM konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (25µM + 25µM) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %29.74, 91.27, 35.37, 92.56, 24.17, 96.85 ve 26.85 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için $p < 0.0001$; ellajik asit için $p < 0.01$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.9).



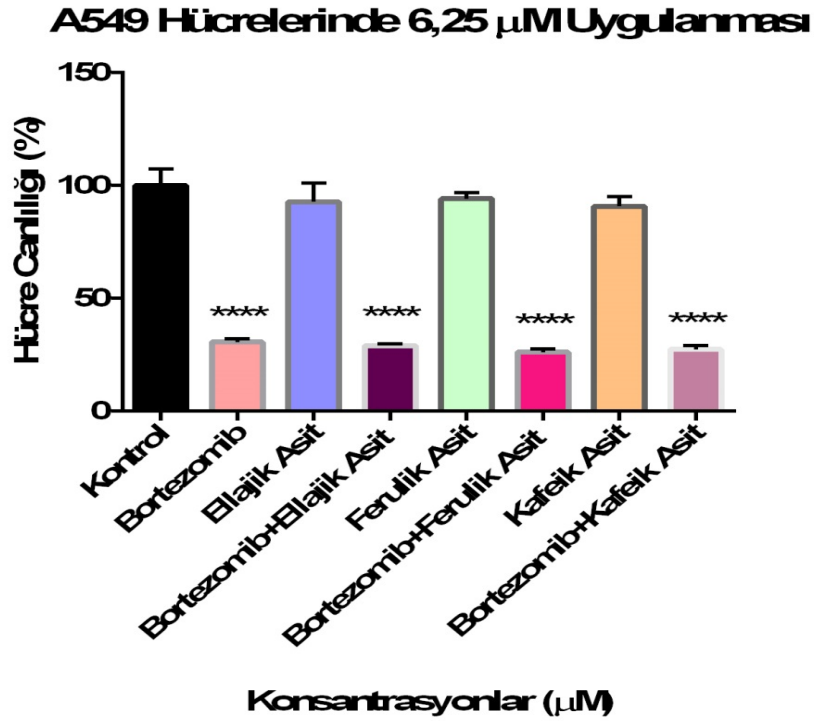
Şekil 5.9. A549 hücrelerinde 25 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$ **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarına göre, A549 hücrelerine 12.5 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (12.5 μ M + 12.5 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %30.42, 91.93, 32.54, 97.05, 25.23, 96.90 ve 26.06 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için $p < 0.0001$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.10).



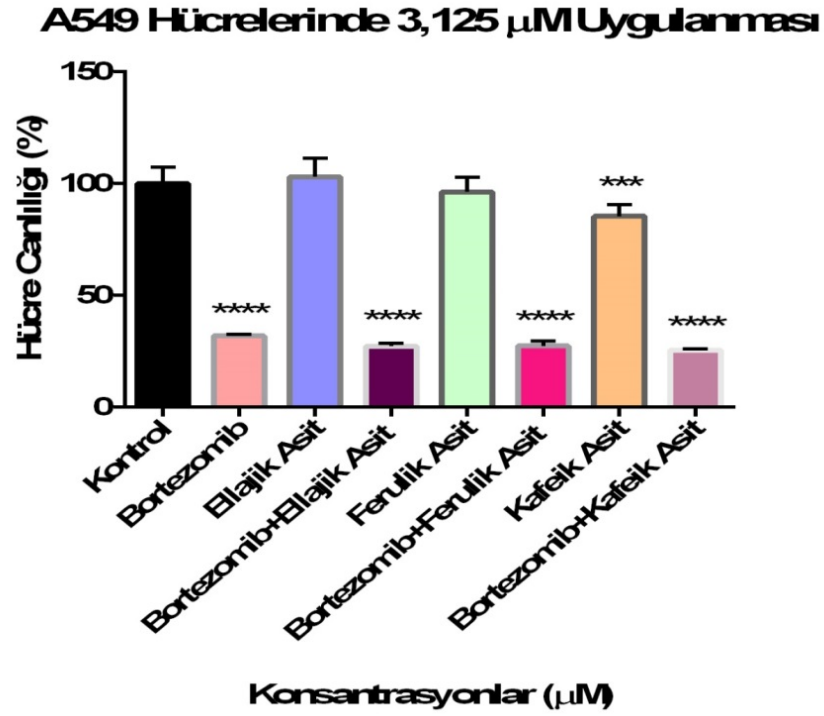
Şekil 5.10. A549 hücrelerinde 12.5 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$. **** $p < 0.0001$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarına göre, A549 hücrelerine 6.25 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (6.25 μ M + 6.25 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %30.70, 92.85, 29.02, 94.13, 26.14, 90.79 ve 27.42 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için $p < 0.0001$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.11).



Şekil 5.11. A549 hücrelerinde 6.25 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$, **** $p < 0.0001$, deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

MTT sonuçlarına göre, A549 hücrelerine 3.125 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (3.125 μ M + 3.125 μ M), gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %31.92, 103.0, 27.25, 96.28, 27.42, 85.44 ve 25.58 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak bortezomib, bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonu için $p < 0.0001$; kafeik asit için de $p < 0.001$ olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. A549 hücrelerinde 3.125 μ M konsantrasyonlardaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bu fenolik bileşiklerin bortezomib ile kombinasyonlarının 24. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları (ortalama $\pm$ standart sapma), $n=7$, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$ deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. (Kontrol: %0.1 DMSO)

5.4. Bortezomibin Ellajik asit, Ferulik asit ve Kafeik asit ile Kombinasyonlarının 3T3, A549 ve Caco-2 Hücreleri Üzerinde Sinerjistik Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

3T3, Caco-2, A549 hücre hatlarına 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M konsantrasyonlardaki, bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit, bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonlarının 24. saat MTT absorbans sonuçlarına göre elde edilen % hücre canlılık değerleri kullanılarak CDI hesaplanmış, sinerjistik ve antagonistik etkiler değerlendirilmiştir (Tablo 5.1-Tablo 5.9) (Zhou vd., 2012).

CDI < 1 sinerjistik, CDI < 0.7 güçlü sinerjistik, CDI = 1 additif ve CDI > 1 antagonistik etkiyi ifade etmektedir (Lopez-Acevedo vd., 2014).

5.4.1. Bortezomibin ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asit ile kombinasyonlarının 3T3 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjist etkileşimleri

Tablo 5.1’de görüldüğü üzere, MTT absorbans sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, 3T3 hücrelerinde bortezomib ve ellajik asit kombin uygulamaları sonucunda, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M konsantrasyonlarda antagonistik etki belirlenmiştir.

Tablo 5.1. 3T3 hücrelerine bortezomib, ellajik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μ m)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Ellajik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Ellajik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	48.68 $\pm$ 7.84	86.06 $\pm$ 3.52	59.8 $\pm$ 1.77	1.42
12.5	46.52 $\pm$ 1.88	96.96 $\pm$ 7.97	70.32 $\pm$ 5.66	1.56
6.25	46.58 $\pm$ 0.45	99.41 $\pm$ 7.49	87.01 $\pm$ 11.44	1.88
3.125	56.92 $\pm$ 8.50	101.12 $\pm$ 5.48	100.49 $\pm$ 4.39	1.75

Tablo 5.2’de görüldüğü üzere, MTT absorbans sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, 3T3 hücrelerinde bortezomib ve ferulik asit kombin uygulamaları sonucunda, 25, 12.5, 6.25 μ M da sinerjistik, 3.125 μ M konsantrasyonda da güçlü sinerjistik etki belirlenmiştir.

Tablo 5.2. 3T3 hücrelerine bortezomib, ferulik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μ m)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Ferulik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Ferulik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	48.68 $\pm$ 7.84	128.3 $\pm$ 17.44	45.63 $\pm$ 1.41	0.73
12.5	46.52 $\pm$ 1.88	132.0 $\pm$ 11.06	44.95 $\pm$ 1.66	0.73
6.25	46.58 $\pm$ 0.45	132.5 $\pm$ 9.42	43.89 $\pm$ 1.05	0.71
3.125	56.92 $\pm$ 8.5	135.82 $\pm$ 19.85	43.18 $\pm$ 1.00	0.56

Tablo 5.3'te görüldüğü üzere, MTT absorbans sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, 3T3 hücrelerinde bortezomib ve kafeik asit kombin uygulamaları sonucunda, 25, 12.5, 6.25, μM da sinerjistik, 3.125 μM konsantrasyonda da güçlü sinerjistik etki belirlenmiştir.

Tablo 5.3. 3T3 hücrelerine bortezomib, kafeik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μM)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Kafeik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Kafeik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	48.68 $\pm$ 7.84	97.35 $\pm$ 7.37	42.59 $\pm$ 1.90	0.9
12.5	46.52 $\pm$ 1.88	105.7 $\pm$ 6.15	42.84 $\pm$ 3.90	0.87
6.25	46.58 $\pm$ 0.45	115.59 $\pm$ 9.37	42.59 $\pm$ 0.92	0.79
3.125	56.92 $\pm$ 8.5	124.44 $\pm$ 10.85	44.65 $\pm$ 2.75	0.63

5.4.2. Bortezomibin ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asit ile kombinasyonlarının Caco-2 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri

Tablo 5.4'te görüldüğü üzere, MTT absorbans sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, Caco-2 hücrelerinde bortezomib ve ellajik asit kombin uygulamaları sonucunda, 25, 12.5, 6.25 μM konsantrasyonlarda antagonistik etki görülürken, 3.125 μM konsantrasyonda ise aditif etki olduğu belirlenmiştir.

Tablo 5.4. Caco-2 hücrelerine bortezomib, ellajik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μM)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Ellajik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Ellajik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	32.71 $\pm$ 6.29	66.07 $\pm$ 9.04	57.96 $\pm$ 5.72	2.68
12.5	39.62 $\pm$ 4.74	78.18 $\pm$ 7.98	51.82 $\pm$ 7.13	1.67
6.25	45.91 $\pm$ 9.4	93.45 $\pm$ 6.12	55.09 $\pm$ 10.78	1.28
3.125	50.96 $\pm$ 3.78	96.12 $\pm$ 6.94	48.8 $\pm$ 2.30	0.997

Tablo 5.5'te görüldüğü üzere, MTT absorbands sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, Caco-2 hücrelerinde bortezomib ve ferulik asit kombin uygulamaları sonucunda 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M konsantrasyonlarda antagonistik etki belirlenmiştir.

Tablo 5.5. Caco-2 hücrelerine bortezomib, ferulik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μ m)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Ferulik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Ferulik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	32.71 $\pm$ 6.29	81.25 $\pm$ 4.13	39.67 $\pm$ 4.6	1.49
12.5	39.62 $\pm$ 4.74	88.86 $\pm$ 3.91	42.48 $\pm$ 4.99	1.2
6.25	45.91 $\pm$ 9.4	85.02 $\pm$ 3.56	44.82 $\pm$ 8.82	1.15
3.125	50.96 $\pm$ 3.78	86.21 $\pm$ 7.46	44.94 $\pm$ 4.93	1.02

Tablo 5.6'da görüldüğü üzere, MTT absorbands sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, Caco-2 hücrelerinde bortezomib ve kafeik asit kombin uygulamaları sonucunda 25, 12.5, 6.25 μ M dozlarında antagonistik, 3.125 μ M da ise güçlü sinerjistik etki belirlenmiştir.

Tablo 5.6. Caco-2 hücrelerine bortezomib, kafeik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μ m)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Kafeik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Kafeik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	32.71 $\pm$ 6,29	68.59 $\pm$ 6.68	41.81 $\pm$ 5.82	1.86
12.5	39.62 $\pm$ 4,74	78 53 $\pm$ 6.63	41.48 $\pm$ 3.73	1.33
6.25	45.91 $\pm$ 9,4	80.23 $\pm$ 6.94	40.38 $\pm$ 5.89	1.1
3.125	50.96 $\pm$ 3,78	80.46 $\pm$ 5.25	26.56 $\pm$ 1.69	0.65

5.4.3. Bortezomibin ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asit ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri

Tablo 5.7’de görüldüğü üzere, MTT absorbans sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, A549 hücrelerinde bortezomib ve kafeik asit kombin uygulamaları sonucunda 25, 12.5, 6.25 μM da antagonistik etki görülürken, 3.125 μM konsantrasyonda da sinerjistik etki belirlenmiştir.

Tablo 5.7. A549 hücrelerine bortezomib, ellajik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μM)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Ellajik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Ellajik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	29.74 $\pm$ 2.33	91.27 $\pm$ 1.53	35.37 $\pm$ 3.37	1.31
12.5	30.42 $\pm$ 1.86	91.93 $\pm$ 5.73	32.54 $\pm$ 3.61	1.16
6.25	30.70 $\pm$ 1.43	92.85 $\pm$ 8.17	29.02 $\pm$ 0.92	1.02
3.125	31.92 $\pm$ 0.61	103.0 $\pm$ 8.32	27.25 $\pm$ 1.45	0.83

Tablo 5.8’de görüldüğü üzere, MTT absorbans sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, A549 hücrelerinde bortezomib ve ferulik asit kombin uygulamaları sonucunda 25, 12.5, 6.25, 3.125 μM konsantrasyonlarda sinerjistik etki belirlenmiştir.

Tablo 5.8. A549 hücrelerine bortezomib, ferulik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μM)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Ferulik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Ferulik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	29.74 $\pm$ 2.33	92.56 $\pm$ 2.06	24.17 $\pm$ 1.74	0.88
12.5	30.42 $\pm$ 1.86	97.05 $\pm$ 3.72	25.23 $\pm$ 1.26	0.85
6.25	30.70 $\pm$ 1.43	94.13 $\pm$ 2.71	26.14 $\pm$ 1.60	0.91
3.125	31.92 $\pm$ 0.61	96.28 $\pm$ 6.70	27.42 $\pm$ 2.17	0.89

Tablo 5.9’da görüldüğü üzere, MTT absorbans sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre, A549 hücrelerinde bortezomib ve kafeik asit kombin uygulamaları sonucunda 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M konsantrasyonlarda sinerjistik etki belirlenmiştir.

Tablo 5.9. A549 hücrelerine bortezomib, kafeik asit ve kombine uygulamaların 24 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μ m)	Bortezomib (% Hücre Canlılığı)	Kafeik Asit (% Hücre Canlılığı)	Bortezomib + Kafeik Asit (% Hücre Canlılığı)	CDI
25	29.74 $\pm$ 2.33	96.85 $\pm$ 1.49	26.85 $\pm$ 1.29	0.94
12.5	30.42 $\pm$ 1.86	96.90 $\pm$ 0.84	26.06 $\pm$ 0.66	0.88
6.25	30.70 $\pm$ 1.43	90.79 $\pm$ 4.41	27.42 $\pm$ 1.81	0.98
3.125	31.92 $\pm$ 0.61	85.44 $\pm$ 5.21	25.58 $\pm$ 0.61	0.94

Sebze, meyve, kepekli tahılların tüketiminin kronik hastalıkların ve özellikle mide, akciğer, pankreas ve kolon gibi çeşitli kanserlerin insidansını azalttığı bilinmektedir. Bu gıdaların antikanser aktiviteleri, bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip ortak bir aromatik halkalı ikincil metabolitler olan fenolik bileşiklerle ilişkilidir. Yapılan çeşitli çalışmalar, fenolik asitlerin hücre canlılığını azaltmada, hücre döngüsünü modüle etmede ve apoptoz indüksiyonu ile tümör ilerlemesini kontrol etmede önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir Kemoterapötik ajanların toksik olduğu ve ciddi yan etkileri olduğu bilinmektedir. Doğal bileşiklerin, bu yan etkileri azaltmanın yanı sıra tedavide kullanılan ajanlarla sinerjik bir etki de gösterebildiği çeşitli çalışmalarla mevcuttur (Eroglu vd., 2018).

Bu tez çalışmasında; akciğer ve kolon kanseri hücrelerinde bir proteozom inhibitörü olan bortezomib ile ellajik asit, ferulik asit, kafeik asitin (25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M) kombinasyonlarının sitotoksik etkileri araştırılmış ve antiproliferatif etkilerine göre hesaplanan CDI oranlarına göre sinerjistik/antagonistik etkileri değerlendirilmiştir.

Hong vd. (2012) yaptığı bir çalışmada 5, 10, 20 nM bortezomibin Colo320HSR, HT 29 ve DLD1 kolon kanseri hücre hatları ile 24 saatlik inkübasyonu sonunda, hücre proliferasyonlarının anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bu etkinin bortezomibin proteazom inhibisyonundan kaynaklanan hücre içi ROS üretiminin artmasıyla ilişkili olarak hücre döngüsünü durdurarak antikanser aktivite gösterdiğini açıklanmıştır (Hong

vd., 2012). Bizim çalışmamızda 24. saat MTT sonuçlarına göre bortezomibin Caco-2 kolon kanseri hücre hattı üzerinde (3.125, 6.25, 12.5, 25 μ M) artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Ando vd. (2014) yaptığı bir çalışmada; A549 akciğer kanseri hücre hattında, 80 nM bortezomib ile CID (kimyasal indüklü dimerizasyon) kombin uygulanması sonucunda sinerjistik bir etki oluşturduğu belirlenmiştir (Ando vd., 2014). Çalışmamızda da A549 hücrelerine bortezomibin ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asit ile kombin uygulamalarının hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplamaları sonuçlarına göre 3.125, 6.25, 12.5, 25 μ M konsantrasyonlarda bortezomibin ferulik asit ve kafeik asit ile kombinasyonlarının, 3.125 μ M konsantrasyonda bortezomib ile ellajik asit kombinasyonunun sinerjist etki gösterdiği belirlenmiştir.

Losso vd. (2004) yaptıkları bir çalışmada ellajik asidin 10-100 μ M konsantrasyon aralığında, 24 saatlik bir inkübasyon sonunda sağlıklı insan akciğer fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermezken, Caco-2 kanser hücresinde seçici bir sitotoksikite ve buna bağlı olarak da antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Losso vd., 2004).

Liu vd. (2018) yaptıkları bir çalışmada ise 48. saatteki MTT deneyi sonucunda, ellajik asidin A549 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre konsantrasyon artışına (5, 10 ve 20 μ M) bağlı olarak önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (Liu vd., 2018). Bu literatür çalışmasında elde edilen veriler bizim çalışma sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Bir başka çalışmada da ellajik asitin 12.5, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda 48 saat inkübasyon sonucunda, SW480 metastatik olmayan kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonu %49-76, SW620 metastatik kolon kanseri hücrelerinde %14-35, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde %0-21, HCT116 kolon kanseri hücrelerinde %53-87 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir (Seeram vd., 2005).

Çalışmamızdaki MTT sonuçlarına göre ellajik asitin 3.125, 6.25, 12.5 ve 25 μ M konsantrasyonlarda A549, 3T3, Caco-2 hücreleri üzerinde, antiproliferatif etkilerinin olduğu belirlenmiş olup, bu etkiyi artan konsantrasyona bağlı olarak en çok 25 μ M konsantrasyonda gösterdiği belirlenmiştir. Literatür çalışmalarıyla bizim elde ettiğimiz sonuçlar birbirini desteklemektedir. Yapılan literatür taramalarında ellajik asitin bortezomib ile kombine uygulamalarının Caco-2, A549 ve 3T3 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi ile ilgili önceden yapılmış çalışmalara rastlanılmamıştır. Ellajik asitin

bortezomib ile kombine uygulamalarının Caco-2 kolon kanseri, A549 akciğer kanseri ve 3T3 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlara göre ellajik asitin bortezomib ile kombin uygulamalarının hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre A549 hücreleri üzerinde 3.125 μ M konsantrasyonda sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Duan ve arkadaşlarının (2019) bir yaptığı çalışmasında da akciğer kanseri H1975 ve HOP62 hücre hatlarında 25 ve 50 μ M ellajik asitin 48 saatte uygulanması sonucunda, kanser hücre proliferasyonlarının azaldığı belirlenmiştir (Duan vd., 2019). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Başka bir çalışmada, insan akciğer (A549) ve kolon adenokarsinomu (HT29-D4) hücre proliferasyonu üzerine kafeik ve ferulik asitin antikanser etkileri araştırılmıştır. A549 ve HT29-D4 hücrelerinde 50, 100, 200, 500, 1000 μ M kafeik ve ferulik asit konsantrasyonları uygulanmıştır. Kafeik asitin A549 hücre canlılığını %17-30 oranında, HT29-D4 hücre canlılığını ise %22-33 oranında; ferulik asitin ise A549 hücre canlılığını %12-25 oranında, HT29-D4 hücre canlılığını %13-27 oranında azalttığı belirlenmiştir (Bouzaïene vd., 2015).

Dihidrokafeik ve dihidroferulik asitin iki farklı Caco-2 ve SW480 kolon adenokarsinom hücrelerinde antiproliferatif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 200 μ M ferulik asidin SW480 hücre proliferasyonunu sırasıyla %40.8 ve %59.9 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Dihidrokafeik ve dihidroferulik asitin, Caco-2'de IC₅₀ değerleri sırasıyla 71.7 ± 1.1 ve 83.1 ± 1.1 μ mol/L olduğu gözlemlenip her iki hücre hattında antiproliferatif etkili olduğu belirlenmiştir (Martini vd., 2019). Bizim çalışmamızdaki MTT sonuçlarına göre ferulik asitin Caco-2 hücreleri üzerinde 25 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını %20 oranında azalttığı belirlenmiştir.

Rosa ve arkadaşlarının (2018) HT-29 insan kolon adenokarsinom hücreleri üzerinde yaptığı bir çalışmada, ferulik asit 0.1 ve 1.0 μ M konsantrasyonlarda hücre canlılığını %35 oranında; 5, 10, 25, 50, 100 μ M gibi daha yüksek konsantrasyonlarda ise %63 oranında azaltmıştır (Rosa vd., 2018).

Janicke vd. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada ferulik asitin, Caco-2 hücrelerinin proliferasyonu ve hücre döngüsü faz dağılımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 1500 μ M konsantrasyondaki ferulik asitin 2-3 günlük tedavisinden sonra Caco-2 hücrelerinin çoğalmasını %43-75 oranında inhibe ettiğini göstermiştir (Janicke vd., 2005).

Çalışmamızdaki MTT sonuçlarına göre ferulik asitin 3.125, 6.25, 12.5 ve 25 μ M konsantrasyonlarda A549, Caco-2 hücreleri üzerinde, antiproliferatif etkilerinin olduğu belirlenmiş olup, bu etkiyi artan konsantrasyona bağlı olarak en çok 25 μ M konsantrasyonda gösterdiği belirlenmiştir. Literatür çalışmalarıyla bizim elde ettiğimiz sonuçlar birbirine paralellik göstermektedir. Yapılan literatür taramalarında ferulik asitin bortezomib ile kombine uygulamalarının Caco-2, A549 ve 3T3 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi ile ilgili önceden yapılmış çalışmalara rastlanılmamıştır. Ferulik asitin bortezomib ile kombine uygulamalarının Caco-2 kolon kanseri, A549 akciğer kanseri ve 3T3 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlara göre ferulik asitin bortezomib ile kombin uygulamalarının hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre 3.125, 6.25, 12.5 ve 25 μ M konsantrasyonlarda A549 ve 3T3 hücreleri üzerinde sinerjistik etki belirlenmiş olup, özellikle 3.125 konsantrasyonda 3T3 hücreleri üzerinde güçlü sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Chiang vd. (2014) yaptığı bir çalışmada kafeik asit türevlerinin insan HCT-116 ve SW-480 kolorektal hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Kafeik asit türevlerinin 5, 10, 20, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında HCT-116 ve SW-480 hücrelerinin proliferasyonunu, konsantrasyonun artışına paralel olarak önemli ölçüde sırasıyla %58-64 oranında inhibe ettiği görülmüştür (Chiang vd., 2014).

Yapılan başka bir çalışmada da kafeik asidin, 2500 μ M konsantrasyonunda HT 29 kolon kanseri hücrelerinin büyümesini %50 inhibe ettiği görülmüştür (Jagannathan, 2012).

Çalışmamızdaki MTT sonuçlarına göre kafeik asitin 3.125, 6.25, 12.5 ve 25 μ M konsantrasyonlarda A549, Caco-2 hücreleri üzerinde, antiproliferatif etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Caco-2 hücreleri üzerinde artan konsantrasyona bağlı olarak 3.125-25 μ M aralığında %20-32 oranlarında hücre canlılığını inhibe ettiği görülmüştür. A549 hücrelerinde ise, en yüksek inhibisyonu 3.125 μ M da %15 oranında göstermiştir. Literatür çalışmalarıyla bizim elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermektedir. Yapılan literatür taramalarında kafeik asitin bortezomib ile kombine uygulamalarının Caco-2, A549 ve 3T3 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi ile ilgili önceden yapılmış çalışmalara rastlanılmamıştır. Kafeik asitin bortezomib ile kombine uygulamalarının Caco-2 kolon kanseri, A549 akciğer kanseri ve 3T3 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik

etkileri ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlara göre kafeik asitin bortezomib ile kombin uygulamalarının hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre 3.125, 6.25, 12.5 ve 25 μ M konsantrasyonlarda A549 ve 3T3 hücreleri üzerinde sinerjistik etki gösterdiği, özellikle 3.125 μ M konsantrasyonda 3T3 hücreleri üzerinde güçlü sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Caco-2 hücrelerinde ise, 3.125 μ M konsantrasyonda güçlü sinerjistik etki göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, proteozom inhibitörü olan bortezomib ile birçok literatür çalışmalarıyla antikanser aktiviteleri belirlenen 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M konsantrasyonlardaki ellajik asit, ferulik asit ve kafeik asitin kombin uygulamalarının A549, Caco-2, 3T3 hücreleri üzerindeki sinerjistik sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır. Tez kapsamında; bortezomib-ellajik asit, bortezomib-ferulik asit ve bortezomib-kafeik asit kombinasyonlarının insan kolon kanser hücre hattı Caco-2, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı A549 ve sağlıklı hücre hattı 3T3 üzerinde sinerjistik sitotoksik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olması nedeniyle özgün bir değer taşımaktadır.

Kanser hücrelerinin farklı özelliklere sahip olması, antikanser tedavisinin sonraki aşamasında hastalığın nüksetmesine yol açabilecek ilaçlara karşı direnç geliştirmesi; kombin kullanımların çalışılması gibi alternatif tedavi yollarına yönlendirmektedir. Bu durum da yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine, yeni kemoterapi rejimlerinin araştırılmasına neden olmaktadır.

Çalışmamızda MTT sonuçlarına göre, Caco-2 ve A549 hücreleri üzerinde 3.125-25 μ M konsantrasyonlar aralığında bortezomib + ellajik, bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonlarının kontrol grubuna göre hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiş olup, 3T3 hücreleri üzerinde ise bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonlarının belirgin sitotoksik etkisi görülmüştür.

CDI hesaplama sonuçlarına göre, 3.125 μ M konsantrasyondaki bortezomib + kafeik asit kombinasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde güçlü sinerjist etki, 3.125 μ M konsantrasyondaki bortezomib + ferulik asit ve bortezomib + kafeik asit kombinasyonlarının da 3T3 hücreleri üzerinde güçlü bir sinerjist etki gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak; *in vitro* ortamda bortezomib ve fenolik asit kombinasyonlarının, sinerjistik sitotoksik etkilerinin ileri moleküler çalışmalar ile de belirlenerek, alternatif antikanser tedavisi için yeni umutlar açacağı kanaati oluşmuştur.

KAYNAKÇA

- Adams, J. (2003). Drug Discov Today. *Millennium Pharmaceuticals*, 8, 307-315.
- Adams, J. (2004-a). The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, 5, 417-421.
- Adams, J. (2004-b). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer*, 4, 349–360.
- Aguilera-Carbo, A., Garcia-Agustince, C.A., Belmares, R.E. and Aguilar, C.N. (2005). Inhibitory effect of ellagic acid from pomegranate husk (*Punica granatum*) and (*Larrea tridentata*) on different food-borne pathogens. Process International Congres Food Safety, Monterrey, Mexico, 1, 1-5.
- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., and Aguilar, C.N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 (2), 189–199.
- Alberts, B., Johnson, A. and Lewis, J., (2002). Molecular Biology of the Cell. (4th edition), New York: Garland Science.
- Almond, J.B. and Cohen, G.M. (2002). The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 16, 433–443.
- Anantharaju, P.G., Gowda, P.C., Vimalambike, M.G., Madhunapantula, S.V. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*, 15 (1), 99.
- Anderle, P. and Sengstag, T. (2005). Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes, *BMC Genomics*, 6, 69–86.
- Ando, M., Hoyos, V., Yagyu, S., et al. (2014). Bortezomib sensitizes non-small cell lung cancer to mesenchymal stromal cell-delivered inducible caspase-9-mediated cytotoxicity. *Cancer Gene Therapy*, 21 (11), 472-482.
- Andreasen, M.F., Kroon, P.A., Williamson, G., Garcia-Conesa, M.T. (2001). Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (3), 304–314.
- Ani, V., Varadaraj, M.C., Naidu, K.A. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technology*, 224, 109–115.

- Artursson, P. and Karlsson, J., (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175 (3), 880–885.
- Aydın, S.A. ve Üstün, F., (2007). Tanenler 1 Kimyasal Yapıları, Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemleri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33 (1), 21-31.
- Barch, D.H. and Fox, C.C. (1988). Selective inhibition of methyl-benzyl nitrosamine induced formation of esophageal O-methylguanine by dietary ellagic acid in rats. *Cancer Research*, 48, 7088-7092.
- Barch, D.H., Rundhaugen, L.M., Thomas, P.E. and Kardos, P. (1994). Dietary ellagic acid inhibits the enzymatic activity of CYP1A1 without altering hepatic concentrations of CYP1 A1 or CYP1 A1 mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201, 1477-1482.
- Bourgine, J., Billaut-Laden, I. (2012). Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: Comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines. *Drug Metabolism and Disposition*, 40 (4), 694–705.
- Bouzaïene, N., Jaziri, S., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., and 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.
- Bray, F., Ferlay J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics, *A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394-424.
- Brenner, H., Kloor, M. and Pox, C.P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*, 383, 1490–1502.
- Briske-Andersson, M.J., Finley, J.W., Newman, S.M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 214, 248–257.
- Brown, E.M., Gill, C.I.R., McDougall G.J., Stewart, D. (2012). Mechanisms underlying the anti-proliferative effects of berry components in vitro models of colon cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 13, 200-209.

- Bruning, A., Vogel, M., Mylonas, I., Friese, K., and Burges, A. (2011). Bortezomib targets the caspase-like proteasome activity in cervical cancer cells, triggering apoptosis that can be enhanced by nelfinavir. *Current Cancer Drug Targets*, 11 (7), 799–809.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74 (17), 2157-2184.
- Chander, M. (2018). Anticancer Efficacy of Some Plant Phenolics - A Recent Scenario. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 1746–1768.
- Chang, R., Huang, M.T., Wood, A., Wong, C.Q., Newmark, H., Yagi, H., Sayer, J., Jerina, D. and Conney, A. (1985). Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo[a]pyrene and (±)-70,8a-dihydroxy-9a,10a-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene on mouse skin and in the newborn mouse. *Carcinogenesis*, 6, 1127-1133.
- Chen, Y.F., Tsai, H.Y., Wu TS (1995). Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*, 61, 2–8.
- Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S. (2011). Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current Cancer Drug Targets*, 11, 239–253.
- Chiang, E.P., Tsai, S.Y., Kuo, Y.H., Pai, M H., Chiu, H L., Rodriguez, R.L., and Tang, F.Y. (2014). Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. *Plos One*, 9 (6), e99631.
- Chirinos, R., Betalleluz-Pallardel, I., Huaman, A., Arbizu, C., Pedreschi, R., Campos, D. (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis Tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 113, 1243–1251.
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79, 13–21.

- Cooper, W.A., Lam, D C., O'Toole, S.A., and Minna, J.D. (2013). Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 5 Suppl, 479–490.
- Çağlar, H.O., Süslüer, S.Y., Kavaklı, Ş., Gündüz C., Ertürk, B., Özkinay, and F., Haydaroğlu, A. (2017). Ellagic acid induced expression of miRNAs in breast cancer stem cells and effect of ellagic acid on apoptosis. *Ege Journal of Medicine*, 56 (4), 183-192.
- Çömlekçi, E., Veyselova Sezer, C., İzgördü, H., Kutlu, M. (2019). In Vitro Assessment of Anti-Proliferative Activities of Ellagic Acid on Human Lung Cancer. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6 (2), 397-403.
- Daphu, I., Horn, S., Stieber, D., Varughese, J.K., Spriet, E., Dale, H.A., Skaftnesmo, K. O., Bjerkvig, R., and Thorsen, F. (2014). In vitro treatment of melanoma brain metastasis by simultaneously targeting the MAPK and PI3K signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (5), 8773–8794.
- Darby, I.A., Hewitson, T.D. (2007). Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *International Review Cytology*, 257, 143-179.
- Darby, I.A., Laverdet, B., Bonte, F., Desmouliere, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, 301-311.
- Demarchi, F., Brancolini, C. (2005). Altering protein turnover in tumor cells: New opportunities for anti-cancer therapies. *Drug Resistance Updates*, 8, 359–368.
- Denizot, F., and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89 (2), 271–277.
- DesJardins-Park, H.E., Foster, D.S., Longaker, M.T. (2018). Fibroblasts and wound healing: an update. *Regenerative Medicine*, 13 (5), 491-495.
- Dick, M. (2020). Histology, Fibroblast. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Dixit, R., Gold, B. (1986). Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (21), 8039-8043.
- Dou, Q.P. and Li, B. (1999). Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resistance Updates*, 2, 215–223.

- Duan, J., Zhan, J.C., Wang, G.Z., Zhao, X.C., Huang, W.D., Zhou, G.B. (2019). The red wine component ellagic acid induces autophagy and exhibits anti-lung cancer activity in vitro and in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23 (1), 143–154.
- Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Kuehn, L., Bureau, J.P. and Ouali, A., (2002). Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *Journal of Immunological Methods*, 260, 183-193.
- Dziedzic, A., Kubina, R., Kabała-Dzik, A. and Tanasiewicz, M. (2017). Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptotic Response of Head and Neck Squamous Carcinoma Cells (Detroit 562) by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester Derivative. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 6793456
- Earnshaw, W.C., (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 7 (3), 337–343.
- Ekinci, Ö. ve Memis, L., (2008). Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında nükleer faktör kappa B immünohistokimyasal ekspresyonunun prognozla ilişkisi. *Gazi Tıp Dergisi*, 19 (1), 1-5.
- El-Tanani, M., Dakir, E., Raynor, B., and Morgan, R. (2016). Mechanisms of Nuclear Export in Cancer and Resistance to Chemotherapy. *Cancers*, 8 (3), 35.
- Engür, S. ve Dikmen, M. (2015). Kanser tedavisinde proteozom inhibitörlerinin önemi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31 (4), 182-190.
- Engür, S., Dikmen M. and Öztürk Y., (2016). Comparison of antiproliferative and apoptotic effects of a novel proteasome inhibitor MLN2238 with bortezomib on K562 chronic myeloid leukemia cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38, (2), 87-97.
- Engür, S. and Dikmen M. (2017). The evaluation of the anti-cancer activity of ixazomib on Caco2 colon solid tumor cells, comparison with bortezomib. *Acta Clinica Belgica*, 72, (6), 391-398.
- Eroglu, C., Avci, E., Secme, M., Dodurga, Y., Vural, H., and Kurar, E. (2018). The Combination Effect of Ferulic Acid and Gemcitabine on Expression of Genes

- Related Apoptosis and Metastasis in PC-3 Prostate Cancer Cells. *European Journal of Biology*, 77 (1), 32-37.
- Fernald, K. and Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biology*, 23 (12), 620-633.
- Field-Smith, A., Morgan, G.J., Davies, F.E., (2006). Bortezomib (Velcade[®]) in the Treatment of Multiple Myeloma. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2 (3), 271-279.
- Fogh, J., Wright, J.C., Loveless, J.D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumours. *Journal of the National Cancer Institute*, 21, 393–408.
- Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M. L. And 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, 359–366.
- Fulda, S. (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International Journal of Cell Biology*, 370835.
- Ganot, N., Meker, S., Reytman, L., Tzuber, A., and Tshuva, E.Y. (2013). Anticancer metal complexes: synthesis and cytotoxicity evaluation by the MTT assay. *Journal of Visualized Experiments*, (81), e50767.
- Genaro-Mattos, T.C., Mauricio, A.Q., Rettori, D., Alonso, A., Hermes-Lima, M. (2015). Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach. *Plos One*, 10, (11), e0142402
- Giard, D.J. (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, 1417–1423.
- Gloria, N.F., Soares, N., Brand, C., Oliveira, F.L., Borojevic, R., Teodoro, A.J. (2014). Lycopene and β -carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, 34, 1377–1386.
- Guo, C.L., Wang, L.J., Zhao, Y., Liu, H., Li, X.Q., Jiang, B., Luo, Guo, S.J., Wu, N., and Shi, D.Y. (2018). A Novel Bromophenol Derivative BOS-102 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human A549 Lung Cancer Cells via ROS-Mediated PI3K/Akt and the MAPK Signaling Pathway. *Marine Drugs*, 25, 16.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S., Jr (1999). NF- κ B controls cell growth and differentiation through

- transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (8), 5785–5799.
- Güleşçi, N., ve Aygöl, İ., (2016). Beslenmede yer alan antioksidan ve fenolik madde içerikli çerezler. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences*, 5, (1).
- Gültekin, N., Karaoğlu, K. ve Küçükateş, E. (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 36, 120-130.
- Halilçolar H., Tatar D., Ertuğrul G., Çakan A., Acıtaş M.G., Kömürcüoğlu B. Epidemiyoloji. In: Akkoçlu A, Öztürk C; eds. (1999). Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım. *Toraks Kitapları*, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 17-22.
- Halliwell B., (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344, (8924), 721-724.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646–667.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system, *Annual Review Biochemistry*, 67, 425-79.
- Hinz, M., (1999). NF-κB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 2690–2698.
- Hochstrasser M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Current Opinion in Cell Biology*, 7, 215–223.
- Holmes-McNary, M. and Baldwin, A.S., Jr (2000). Chemopreventive properties of transresveratrol are associated with inhibition of activation of the kappaB kinase. *Cancer Research*, 60 (13), 3477–3483.
- Hong, Y.S., Hong, S.W., Kim, S.M., et al. (2012). Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1. *International. Journal Oncology*, 41 (1), 76-82.
- Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., et al. (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 650–664.

- Huang, W.Y., Cai, YZ., Zhang, Y. (2009). Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*, 62, 1-20.
- Hudson, E.A., Dinh, P.A., Kokubun, T., Simmonds, M.S., Gescher, A. (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 9, 1163–1170.
- Huetz, P., Mavaddat, N. and Mavri, J., (2005). Reaction between ellagic acid and an ultimate carcinogen. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45 (6), 1564-1570.
- Hurley R.E. (1998). Interactions of N-methyl-N-nitrosourea and ellagic acid in developmental toxicology. *Doctor of Philosophy Thesis*, Colorado State University, Colorado.
- Jaganathan S.K. (2012). Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *The Scientific World Journal*, 372345.
- Janicke, B., Onning, G., 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 Food Chemistry*, 53, 6658-6665.
- Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Onning, G., Akesson, B, et al. (2011). He 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, 611-622.
- Johnson, I.T. (2007). Gut health, genetics and personalised nutrition. *Genes and Nutrition*, 2, 53-54.
- Kabala-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzebska-Stojko, Z., Stojko, R., Wojtyczka, R.D., Stojko, J. (2017). Comparison of Two Components of Propolis: Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Molecules*, 22, 1554.
- Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., et al. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D

- human breast cancer cells, potential mechanisms of actions. *Breast Cancer Research*, 6, 63-74.
- Kang, N.J., Lee, K.W., Shin, B.J., Jung, S.K., Hwang, M.K., Bode, A.M., et al. (2009). Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*, 30, 321–330.
- Karin M., Cao Y., Greten F.R., Li Z.W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer*, 2 (4), 301-310.
- Krętowski, R., Borzym-Kluczyk, M. and Cechowska-Pasko, M. (2014). Hypoxia enhances the senescence effect of bortezomib--the proteasome inhibitor--on human skin fibroblasts. *BioMed Research International*, 196249.
- Kukan M. (2004). Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs. *Journal of the Physiology and Pharmacology*. 55, 3-15.
- Kumar, A., Hozo, I., Wheatley, K., Djulbegovic, B., (2011). Thalidomide versus bortezomibbased regimens as firstline therapy for patients with multiple myeloma: a systematicreview. *American Journal of Hematology*, 86, 18–24.
- Landis-Piwowar, K. R., Milacic, V., Chen, D., Yang, H., Zhao, Y., Chan, T. H., Yan, B., and Dou, Q. P. (2006). The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 9 (6), 263–273.
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx K. et al. (eds). *The Impact of Food Bioactives on Health*, Springer, Cham, 103-111.
- Lee, Y.S. (2005). Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acid in HepG2 hepatoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, 28, 1183–1189.
- Lesca, P. (1983). Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene-induced neoplasia in mice. *Carcinogenesis*, 4, 1651-1653.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. and Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 17, 62–70.
- Lin, C.L., Chen, R.F., Chen, J.Y., Chu, Y.C., Wang, H.M., Chou, H.L., Chang, W.C., Fong, Y., Chang, W.T. Wu, C.Y., et al. (2012). Protective effect of caffeic acid on paclitaxel induced anti-proliferation and apoptosis of lung cancer cells

- involves NF- κ B pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6236–6245.
- Liu, Q., Liang, X., Niu, C., and Wang, X. (2018). Ellagic acid promotes A549 cell apoptosis via regulating the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16 (1), 347–352.
- Lopez-Acevedo, M., Grace, L., Teoh, D. *et al.* (2014). Dasatinib (BMS-35482) potentiates the activity of gemcitabine and docetaxel in uterine leiomyosarcoma cell lines. *Gynecologic Oncology Research and Practice*, 1, 2.
- Losso, J.N., Bansode, R.R., Trappey, A., 2nd, Bawadi, H.A., and Truax, R. (2004). In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15 (11), 672–678.
- LS, R. and Nja, S., (2016). Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6, 10–4172.
- Manasanch E.E., Orlowski R.Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14, 417–433.
- Mandal, S. and Stoner, G.D. (1990). Inhibition of iV-nitrosobenzylmethylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by ellagic acid. *Carcinogenesis*, 11, 55–61.
- Mani, A., Gelmann, E.P. (2005). The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 4776–89.
- Martini, S., Conte A., and Tagliazucchi D., (2019). Antiproliferative Activity and Cell Metabolism of Hydroxycinnamic Acids in Human Colon Adenocarcinoma Cell Lines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, (14), 3919–3931.
- Moktar, A., Ravoori, S., Vadhanam, M.V., Gairola, C.G. and Gupta, R.C., (2009). Cigarette smoke-induced DNA damage and repair detected by the comet assay in HPV-transformed cervical cells. *International Journal of Oncology*, 35 (6), 1297–1304.
- Mori, H., Kawabata, K., Yoshimi, N., Tanaka, T., Murakami, T., Okada, T., Murai, H. (1999). Chemopreventive effects of ferulic acid on oral and rice germ on large bowel carcinogenesis. *Anticancer Research*, 19, 3775–3778.

- Mukhtar, H., Das, M., Del Tito., B. and Bickers, D. (1984). Protection against 3-methylcholanthrene-induced skin tumorigenesis in BALB/c mice by ellagic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 119, 751-757.
- Mukhtar, H., Das, M. and Bickers, D. (1986). Inhibition of 3-methylcholanthrene-induced skin tumorigenicity in BALB/c mice by chronic oral feeding of trace amounts of ellagic acid in drinking water. *Cancer Research*, 46, 2262-2265.
- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6 (5), 369–381.
- 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 Lipids Lipid Metabolism*, 573, 276–295.
- Ng, S.H. (2011). Characterization of Colon Cancer Cell Culture Based Screening Assay to Study Effects of Phenolic Acids. University of Saskatchewan.
- Notka, F., Meier, G.N., Wagner, R.N. (2004). Concerted inhibitory activities of phyllanthus amarus on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Research*, 64, 2, 93–102.
- Olsson, M.E., Ekvall, J., Gustavsson, K.E., Nilson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Akesson, B., Nyman, M.G.L. (2004). Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of cultivar, ripening and storage. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 9, 2490–2498.
- Onori, P., DeMorrow, S., Gaudio, E., Franchitto, A., Mancinelli, R., Venter, J., Kopriva, S., Ueno, Y., Alvaro, D., Savage, J., Alpini, G., & Francis, H. (2009). Caffeic acid phenethyl ester decreases cholangiocarcinoma growth by inhibition of NF-kappaB and induction of apoptosis. *International Journal of Cancer*, 125 (3), 565–576.
- Orsolić, N., Terzić, S., Mihaljević, Z., Sver, L., Basić, I. (2005). Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 10, 1928–1933.
- Papandreou, C.N., Logothetis, C.J., (2004). Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Research*, 64, 5036–5043.

- Papoutsis, Z., Kassi, E., Tsiapara, A., Fokialakis, N., Chrousos, G. P. and Moutsatsou, P., (2005). Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ER α and ER β . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (20), 7715-7720.
- Pepin, P., Rossignol, G. and Castonguay, A. (1990). Inhibition of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by ellagic acid and butylated hydroxyanisole. *Cancer Journal*, 3, 266-273.
- Pinto, M.S., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries. *Food Chemistry*, 107, 1629–1635.
- Plati, J., Bucur, O., Khosravi-Far, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology*, 3, 279-96.
- Ramos, A.A., Lima, C.F. and Pereira-Wilson, C., (2011). DNA damage protection and induction of repair by dietary phytochemicals and cancer prevention, what do we know?. *Selected Topics in DNA Repair*, 237-270.
- Ri, M. (2016). Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *International Journal of Hematology*, 104, 273–280.
- Richardson, P.G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Munshi, N., Anderson, K., (2007). New drugs for myeloma. *Oncologist*, 12(6), 664-89.
- Riihimäki, M., Hemminki, A., Sundquist, J. (2016). Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Scientific Reports*, 6, 29765.
- Rivera, G. A. and Wakelee H. (2016). Lung Cancer in Never Smokers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 893, 43-57.
- Roeten, M.S.F., Cloos, J. and Jansen, G. (2018). Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 81, 227–243.
- Rosa, L.S., Silva, N.J.A., Soares, N.C.P., Monteiro M.C. and Teodoro A.J. (2016). Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer-A Review. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6, 1-7.
- Rosa, L.S., Jordão, N.A., da Costa Pereira Soares, N., deMesquita, J.F., Monteiro, M., and 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.
- Sala A., Recio M.D., Giner R.M., Manez S., Tournier H., Schinella G., Rios J.L. (2002). Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54, (3), 365-371.
- Saxena, M., Saxena, J., and Pradhan, A., (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16 (2), 130-134.
- Scagliotti, G., (2006). Proteasome inhibitors in lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 58, 177–189.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., and Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16 (6), 360–367.
- Sethi, T., Rintoul, R.C., Moore, S.M., MacKinnon, A.C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E.R., Dransfield, I., Donnelly, S.C., Strieter, R., and Haslett, C. (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature Medicine*, 5 (6), 662–668.
- Shahidi, F., Naczki, M., (1995). Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications. Technomic, U.S.A.
- Shapiro, D.L., Nardone, L.L., Rooney, S.A., Motoyama, E.K. and Munoz, J.L. (1978). Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 530, 197–207.
- Shugart, L. and Kao, J. (1984). Effect of ellagic and caffeic acids on covalent binding of benzo[a]pyrene to epidermal DNA of mouse skin in organ culture. *International Journal of Biochemistry*, 16, 571-573.
- Soares, N.C.P., Machado, C.L., Trindade, B.B., Lima, I.C.C., Gimba, E.R.P., Teodoro, A.J., Takiya, C., Borojevic, R. (2017). Lycopene extracts from different tomato-based food products induce apoptosis in cultured human primary prostate cancer cells and regulate TP53, Bax and Bcl-2 transcript expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18, 339–345.

- Srinivasulu, C., Ramgopal, M., Ramanjaneyulu, G., Anuradha, C. M., and Suresh Kumar, C. (2018). Syringic acid—A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 547–557.
- Sun, L., Wang, K., Xu, X., Ge, M., Chen, Y., and Hu, F. (2017). Potential Protective Effects of Bioactive Constituents from Chinese Propolis against Acute Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in Cardiac H9c2 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7074147.
- Terzia J., Grivennikov S., Karin E., Karin M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2101-2114.
- Thulstrup, P.W., Thormann, T., Spangetlarsen, J. and Bisgaard, H.C., (1999). Interaction between ellagic acid and calf thymus DNA studied with flow linear dichorism UV–VIS spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265, 416–421.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *A Cancer Journal of Clinicians*, 65, 87–108.
- Travis W.D., Travis L.B., Devesa S.S., (1995). Lung cancer. *Cancer*, 75, 191-202.
- Tracy, L.E., Minasian, R.A. and Caterson, E.J. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in Wound Care*, 5 (3), 119-136.
- Turner, N., Pearson, A., Sharpe, R., Lambros, M., Geyer, F., Lopez-Garcia, M.A., et al. (2010). FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is therapeutic target in breast cancer. *Cancer Research*, 70 (5), 2085-2094.
- van Breda, S.G., de Kok, T.M., van Deli, J.H. (2008). Mechanisms of colorectal and lung cancer prevention by vegetables: a genomic approach. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 139-157.
- Vermeulen, K., van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. (2003-a). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36, 3, 131-149.
- Vermeulen, K., Berneman, Z.N., vanBockstaele, D.R., (2003-b). Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*, 36, 165-75.

- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 1015-1068.
- Waladkhani, A.R., Clemens, M.R., (2001). Effect of dietary phytochemicals on cancer development. *Vegetables, Fruits and Herbs in Health Promotion*, 1, 17.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Jr (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281 (5383), 1680-1683.
- Watzl, B. and Leitzmann, C., (2005). Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates.
- Wood, A.W., Huang, M.T., Chang, R.L., (1982). Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: exceptional activity of ellagic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79 (18), 5513-5517.
- Yamada, J., Tomita, Y. (1996). Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 328–329.
- Yang, G., Fu, Y., Malakhova, M., Kurinov, I., Zhu, F., Yao, K., Li, H., Chen, H., Li, W., Lim, D.Y., et al. (2014). Caffeic acid directly targets ERK1/2 to attenuate solar UV-induced skin carcinogenesis. *Cancer Prevention Research*, 10, 1056–1066.
- Yang, H., Landis-Piowar, K.R., Chen D., Milacic, V., Dou, Q.P. (2008). Natural compounds with proteasome inhibitory activity for cancer prevention and treatment. *Current Protein and Peptide Science*, 9 (3), 227-239.
- Yildiz-Ozer, M., Oztopcu-Vatan, P., and Kus, G. (2018). The investigation of ceranib-2 on apoptosis and drug interaction with carboplatin in human non small cell lung cancer cells in vitro. *Cytotechnology*, 70 (1), 387–396.
- Yue, S.J., Zhang, P X., Zhu, Y., Li, N.G., Chen, Y.Y., Li, J.J., Zhang, S., Jin, R.Y., Yan, H., Shi, X.Q., Tang, Y.P., and Duan, J.A. (2019). A Ferulic Acid Derivative FXS-3 Inhibits Proliferation and Metastasis of Human Lung Cancer A549 Cells via Positive JNK Signaling Pathway and Negative ERK/p38, AKT/mTOR and MEK/ERK Signaling Pathways. *Molecules*, 24 (11), 2165.

- Zhang, Y., Li, H., Zhang, J. *et al.* (2019). The combinatory effects of natural products and chemotherapy drugs and their mechanisms in breast cancer treatment. *Phytochemistry Reviews*.
- Zhou, X., Zhang, Y., Li, Y., Hao, X., Liu, X. and Wang, Y., (2012). Azithromycin Synergistically Enhances Anti-Proliferative Activity of Vincristine in Cervical and Gastric Cancer Cells. *Cancers*, 4, 1318-1332.
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.P., Li, S., Chen, Y.M. and Li, H.B. (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 8, 515.
- Zhu F., Dai C., Fu Y., Loo J.F., Xia D., Gao S.P., Ma Z. and Chen Z. (2016). Physalin A exerts antitumor activity in non-small cell lung cancer cell lines by suppressing JAK/STAT3 signaling. *Oncotarget*, 7, 9462–9476.
- Http-1: <https://www.cancer.gov/aboutcancer/understanding/what-is-cancer> (Erişim Tarihi: 05.04.2020)
- Http-2: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx#characteristics> (Erişim Tarihi: 12.04.2020)
- Http-3: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#> (Erişim Tarihi: 12.04.2020)
- Http-4: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRM-CCL185.aspx#generalinformation> (Erişim Tarihi: 12.04.2020)
- Http-5: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx> (Erişim Tarihi: 12.04.2020)
- Http-6: <http://www.nih3t3.com/> (Erişim Tarihi: 15.04.2020)
- Http-7: <https://tr.qwe.wiki/wiki/Bortezomib> (Erişim Tarihi: 22.05.2020)
- Http-8: https://tr.qwe.wiki/wiki/Ellagic_acid (Erişim Tarihi: 25.05.2020)
- Http-9: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/128708?lang=en®ion=TR> (Erişim Tarihi: 25.05.2020)
- Http-10: <https://www.tcichemicals.com/AU/en/p/C0002> (Erişim Tarihi: 26.05.2020)