

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GALLİK ASİT VE OLAPARİB KOMBİNASYON TEDAVİSİNİN
OLAPARİBE DİRENÇLİ KANSER HÜCRELERİNDEKİ
ANTİNEOPLASTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE BÜŞRA USCA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET KADİR ERDOĞAN**

BİNGÖL-2022

ÖNSÖZ

Tez çalışmaları süresince yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmaların tamamlanabilmesi için olağanüstü desteğini gördüğüm çok kıymetli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini benimle paylaşan ve desteğini hep yanımda hissettiğim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamda proje desteklerinden (Proje No: BAP-FEF.2020.00.007) dolayı Bingöl Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarımdaya desteklerinden dolayı Yusuf Toy'a teşekkür ederim.

Son olarak, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen, her daim desteklerini yanımda hissettiğim anneme, babama, kayınvalideme, kayınbabama, tezin hazırlanması sırasında gösterdiği ilgi, fedakarlık ve desteğinden dolayı sevgili eşim Üsame Ali USCA ve şükür sebebim canım oğlum Ahmet Enes USCA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Ayşe Büşra USCA
Bingöl, 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Hücre Kültürü.....	16
3.2.2. Olaparib ve Gallik Asit Stoklarının Hazırlanması.....	17
3.2.3. Olaparib Dirençli U2OS Hücrelerinin Oluşturulması.....	17
3.2.4. Hücre Canlılığı Deneyi.....	18
3.2.5. Sinerjizmin Belirlenmesi	19
3.2.6. Koloni Sağkalımı Deneyi	19
3.2.7. Wound Healing Analizi	19
3.2.8. Apoptozun Morfolojik Olarak İncelenmesi	20
3.2.9. Anti-anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi	20
3.2.10. Western Blot ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	21
3.2.11. İstatistiksel Analizler	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Sitotoksosite ve Kombinasyon İndeksi Bulguları.....	23
4.2. Koloni Sağ Kalımı Bulguları.....	27
4.3. Yara İyileşmesi Bulguları.....	29
4.4. Anjiyogenez Bulguları.....	31

4.5. Apoptotik İndeks Bulguları.....	33
4.6. Western Blot Bulguları.....	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR LİSTESİ.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
μL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
CO_2	: Karbondioksit
kDa	: Kilo dalton
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
OL	: Olaparib
GA	: Gallik asit
U2OS	: İnsan osteosarkoma hücre hattı
U2OS-PIR	: Olaparibe karşı direnç kazandırılmış U2OS insan osteosarkoma hücreleri
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
IC_{50}	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
α	: Alfa
Bax	: Bcl-2 ilişkili x proteini
Bcl-2	: B hücreli lenfoma-2
p53	: Tümör protein 53
p21	: Sikline bağlı kinaz inhibitörü 1
cPARP	: Cleaved Poli (ADP-riboz) polimeraz
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
FBS	: Fetal bovin serum
DPBS	: Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuz çözeltisi
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
KCl	: Potasyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
HCl	: Hidroklorik asit
NaF	: Sodyum florür

Na ₃ VO ₄	: Sodyum orthovanadate
NaN ₃	: Sodyum azit
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
PMSF	: Fenil metil sülfonil florür
DTT	: Dithiothreitol
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
DMSO	: Dimetil sülfoksit
NP-40	: Nonidet P-40
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	: Etilenglisoltetraasetik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
NaOH	: Sodyum hidroksit
PVDF	: Poliviniliden diflorid
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi
TBS-T	: tris tamponlu salin ve Tween 20 karışımı
ECL	: Hassas kemilüminesans görüntüleme
w / v	: Hacimde ağırlıkça yüzde
v / v	: Hacimde hacimce yüzde

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Olaparipin kimyasal formülü	3
Şekil 1.2.	Gallik asitin kimyasal formülü	3
Şekil 2.1.	Apoptoz ve kanser arasındaki ilişki	7
Şekil 2.2.	VEGF oluşumu	10
Şekil 2.3.	Metastaz oluşum şeması	11
Şekil 2.4.	PARP inhibitörlerinin etki mekanizması	12
Şekil 4.1.	Gallik asit ve olaparib ile 72 saat tedavi edilen parental U2OS hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafikleri.....	24
Şekil 4.2.	Gallik asit ve olaparib ile 72 saat tedavi edilen olaparib dirençli U2OS (U2OS-PIR) hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafikleri	25
Şekil 4.3.	GA, OL ve OL + GA ile tedavi edilen U2OS hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri.....	28
Şekil 4.4.	GA, OL ve OL + GA ile tedavi edilen U2OS-PIR hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri.....	29
Şekil 4.5.	U2OS-PIR hücreleri ile gerçekleştirilen yara iyileşmesi analizi sonuçları.....	30
Şekil 4.6.	Olaparib, gallik asit ve olaparib + gallik asit kombinasyon tedavileri sonucunda U2OS-PIR hücrelerindeki VEGF miktarlarını gösteren grafik.....	32
Şekil 4.7.	Kontrol, OL, GA ve OL + GA ile tedavi edilen; U2OS-PIR hücrelerinin morfolojik görünümü.....	34
Şekil 4.8.	Olaparib, gallik asit ve olaparib + gallik asit kombinasyon tedavileri sonucunda U2OS-PIR hücrelerindeki cPARP, Bax, Bcl-2, Cas-9, p53 ve p21 proteinlerinin ifade düzeylerini gösteren bant görüntüleri.....	36
Şekil 4.9.	GA, OL ve OL + GA ile tedavi edilen U2OS-PIR hücrelerinde cPARP, Bax, Bcl-2, Cas-9, p53 ve p21 proteinlerinin ifade düzeyleri	37

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. Western blot analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikolar ve dilüsyon oranları	22
Tablo 4.1. Mono- ve kombine- tedaviler sonucunda belirlenen IC50 dozları ve kombinasyon indeksleri.....	26

GALLİK ASİT VE OLAPARİB KOMBİNASYON TEDAVİSİNİN OLAPARİBE DİRENÇLİ KANSER HÜCRELERİNDEKİ ANTİNEOPLASTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Kanser, günümüzde en tehlikeli hastalıklardan birisidir ve dünya üzerindeki en önemli ölüm sebepleri arasında yer almaktadır. Kanserın klinik tedavisinde kullanılan kemoterapotik ajanlar ciddi yan etkilere sahiptir. Ayrıca bu ajanlara karşı gelişen kazanılmış ilaç direnci, kanser ile mücadelenin önündeki en büyük engellerdendir. Bu kemoterapotiklerin bitkisel fenolik bileşiklerle kombine olarak kullanımları, yan etkilerin azaltılmasını veya ortadan kaldırılmasını ve kazanılmış ilaç direncine karşı etkili olmasını sağlayabilmektedir. Bitkilerin ana biyoaktivite kaynağı olan fitokimyasallar, insan sağlığı üzerinde antikarsinojen, antimutajen, antiproliferatif, antioksidan, antimikrobiyal, nöro ve kardiyoprotektif etkilere sahiptirler. Tedaviye destek olmaları, toksik olmamaları, çok hedefli olmaları ve genellikle ilaçlarla sinerjik etki göstermeleri, doğal terapötikleri çok önemli kılmaktadır.

Bu çalışmada, küçük molekül PARP inhibitörü olarak klinik öncesi ve klinik araştırmalarda başarılı sonuçlar sağlayan olaparib ile fenolik bir bileşik olan gallik asidin mono- ve kombine-terapotik antikanser etkileri, olaparibe karşı direnç kazandırılmış U2OS insan osteosarkoma hücrelerinde (U2OS-PIR) incelendi. Parental U2OS ve U2OS-PIR hatları artan konsantrasyonlarda olaparib ve gallik asit ile tedavi edildi ve sitotoksik etki WST-1 hücre canlılığı analizi ile ölçüldü. IC50 dozları belirlenen olaparib ve gallik asitin sinerjistik etkisi kombine tedavi ile belirlendi. Koloni sağkalımı deneyi ile olaparib ve gallik asit kombinasyonunun kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini baskılama potansiyeli ortaya konuldu. Gallik asit ve olaparib ile mono- ve kombine-olarak tedavi edilen U2OS-PIR hücrelerindeki apoptotik etki Akridin oranj/etidyum bromür ikili boyama yöntemi ile, anti-anjiyogenik etki VEGF ELISA yöntemi ile, DNA hasarı ve apoptotik sinyal yollarındaki proteinlerin ekspresyonları üzerine olan etki ise Western blot yöntemi ile analiz edildi.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, gallik asitin olaparib direncine karşı özellikle kombine tedavide hücrelerin canlılığını ve koloni sağkalımlarını baskıladığını, anjiyogenezi inhibe ettiğini, cPARP, Bcl-2 ve Bax gibi apoptozla ilişkili proteinleri regüle ederek hücrelerde DNA hasarı ve apoptoza neden olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, gallik asitin kazanılmış ilaç direncine karşı terapötik etkinliği artırıcı bir bileşik olarak göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gallik asit, olaparib, U2OS, kanser, apoptoz, anjiyogenez.

INVESTIGATION OF THE ANTINEOPLASTIC EFFECT OF GALLIC ACID AND OLAPARIB COMBINATION THERAPY ON OLAPARIB-RESISTANT CANCER CELLS

ABSTRACT

Cancer is one of the most dangerous diseases today and is among the most important causes of death in the world. Chemotherapeutic agents used in the clinical treatment of cancer have serious side effects. In addition, acquired drug resistance against these agents is one of the biggest obstacles to the fight against cancer. The use of these chemotherapeutics in combination with herbal phenolic compounds can reduce or eliminate side effects and be effective against acquired drug resistance. Phytochemicals, which are the main source of bioactivity of plants, have anticarcinogen, antimutagen, antiproliferative, antioxidant, antimicrobial, neuro and cardio-protective effects on human health. The fact that they support treatment, are non-toxic, multi-targeted, and generally have a synergistic effect with drugs makes natural therapeutics very important.

In this study, the mono- and combined-therapeutic anticancer effects of olaparib, which is a small molecule PARP inhibitor with successful results in preclinical and clinical studies, and gallic acid, a phenolic compound, were investigated in U2OS human osteosarcoma cells (U2OS-PIR) resistant to olaparib. Parental U2OS and U2OS-PIR lines were treated with increasing concentrations of olaparib and gallic acid, and the cytotoxic effect was measured by WST-1 cell viability assay. The synergistic effect of olaparib and gallic acid, which IC₅₀ doses were determined, was determined by combined treatment. The colony survival assay demonstrated the potential of the combination of olaparib and gallic acid to suppress the colony forming capacity of cancer cells. Apoptotic effect in U2OS-PIR cells treated mono- and combined-with gallic acid and olaparib by acridine orange/ethidium bromide dual staining assay, anti-angiogenic effect by VEGF ELISA method, and the effect on DNA damage and expression of proteins in apoptotic signaling pathways was analyzed by western blot method.

The findings of this study show that gallic acid suppresses cell viability and colony survival, inhibits angiogenesis, and causes DNA damage and apoptosis in cells by regulating apoptosis-related proteins such as cPARP, Bcl-2 and Bax, especially in combination therapy against olaparib resistance. These findings suggest that gallic acid should be considered as a compound that enhances therapeutic efficacy against acquired drug resistance.

Keywords: Gallic acid, olaparib, U2OS, cancer, apoptosis, angiogenesis.

1. GİRİŞ

Hücrelerin kontrolden çıkıp zararlı hale gelerek sınırsız bir şekilde bölünmesi ve çoğalması kanser olarak tanımlanır (Sayın, 2021). Bu kontrolsüz bölünmeler, hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve kontrollü ölümünde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin mutasyona uğramasından ve bu mutasyonların birikmesi sonucu ortaya çıkan toplu gen ifadesi bozukluğundan kaynaklanır. Mutasyonlar genetik ve çevresel olmak üzere pek çok faktöre bağlı olarak meydana gelebilir (Imani et al., 2021). 2020 yılında dünya çapında tahmini olarak 19,3 milyon yeni kanser vakası görülmüştür. Ve yaklaşık olarak 10 milyon civarında kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir (Sung et al., 2021).

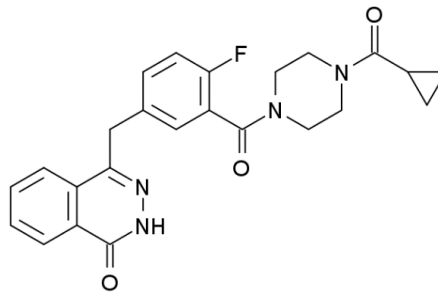
Osteosarkoma, özellikle çocuk ve genç erişkinlerde en çok karşılaşılan kemik kanseri türüdür (Yan et al., 2016). Bu kanser çeşidi herhangi bir kemikte meydana gelebilir (Fan et al., 2015). Buna rağmen osteosarkoma %75'i diz çevresinde görülmektedir (Hogendoorn et al., 2010). Osteosarkomalar en yaygın olarak uzun kemiklerde, özellikle distal femur ve proksimal tibiada oluşur. Çoğunlukla çok yüksek dereceli tümörlerdir (Siclari and Qin, 2010). Günümüzde kemik kanseri tedavisinde cerrahi ve kemoterapi yöntemlerine başvurulmaktadır (Shaikh et al., 2016). Osteosarkomanın tedavisinde kemoterapiye direnç büyük bir engel teşkil etmektedir. İlaç direnci ve bunun sonucunda ilaç tedavisinin etkisizliği kansere bağlı ölümlerin %90'ından sorumludur (Organization, 2016).

Kanser tedavisinde son yıllarda önemli gelişmeler sağlanmıştır. Ancak kanser günümüzde hala ciddi bir sağlık problemi olarak bilinmektedir. Bu nedenle yeni yaklaşımların geliştirilmesi için büyük çaba harcanmaktadır (Shewach and Kuchta, 2009). Kansere yakalanan bireylerde ölüm oranlarının fazla olması, ayrıca kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerinin ciddi yan etkilerinin olması bilinen bir gerçektir. Bu durum hastalıkla mücadelede alternatif yöntemlerin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle bitkisel kaynaklı bileşikler kanser tedavisinde önemli bir kaynak olarak görülmektedir (Erdogan et al., 2021).

Lokalize solid tümörler genellikle erken evrelerinde cerrahi yöntemle tedavi edilir. Ancak ileri evrelerde ve/veya cerrahi sonrasında hedefe yönelik tedaviler, radyoterapi, immünoterapi ve kemoterapi gibi diğer tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Kemoterapötik ilaçlar sıklıkla kullanılmasına rağmen, ilaçların çözünürlüğü ve kararsızlığı, spesifik olmayan ilaç dağılımı ve sistemik toksisiteye bağlı yan etkiler gibi kanser tedavisinde kullanılmalarında önemli dezavantajlar vardır. Ayrıca bazı hastalarda tedavinin başlangıcında olumlu yanıt alınsa dahi kanser yeniden nüksedebilmektedir (Maleki Dana et al., 2022).

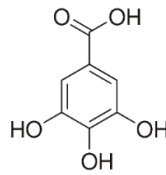
Hem edinilmiş hem de içsel süreçler kanser hücrelerinde kemorezistansa yol açabilir. Edinilmiş ilaç direnci, başlangıçta etkili olan bir terapötik yaklaşıma karşı yeni gelişen bir direnci gösterir. İçsel kemorezistans, bir ilacın etkisiz olmasına neden olan önceden var olan bir faktörü içerir. Tümör hücrelerinin heterojenliği, kemorezistansa yol açan faktörlerden biridir. Bir tümör içinde çeşitli hücre nesilleri vardır ve her klon bir dereceye kadar kemoterapötik ajanlara duyarlıdır. Bu nedenle tümör hücrelerinin tek bir ajanla hedeflenmesi olumlu yanıt vermeyebilir. İlaç hedefindeki değişiklikler, apoptoz ve onarım sinyal yolları, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara direncinde rol oynayan diğer mekanizmalardır (Maleki Dana et al., 2022).

Bir poli-ADP riboz polimeraz (PARP) enzimi inhibitörü olan olaparibin molekül ağırlığı 435,08 g/mol ve formül yapısı $C_{24}H_{23}FN_4O_3$ şeklindedir (Şekil 1.1). Olaparibin pek çok yan etkisi bulunmaktadır. Bunlar kusma, mide bulantısı, iştahsızlık, yorgunluk, kas ve eklem ağrısı, düşük kan sayımı şeklinde kendini gösterebilir. Olaparibin toksisitesini ve maruz bıraktığı olumsuz etkileri azaltan ve olaparip ile aynı minvalde çalışan yeni tedavi yöntemlerinin oluşturulması, kanserle mücadelede bireylerin, uygulanan tedaviden olumlu sonuç almalarını sağlamak ve yaşam kalitesini iyileştirmek için oldukça elzemdir (Heller et al., 1996).



Şekil 1.1. Olaparipin kimyasal formülü (URL, 2022a)

Gallik asit, çay, üzüm, keçiboynuzu, sumak, çilek ve diğer meyvelerde fazla miktarda bulunan endojen bir bitki polifenoldür (Şekil 1.2). Erime noktası 250 °C ve suda çözünürlüğü 20 °C'de %1.1 olan sarımsı beyaz bir kristaldir (moleküler kütle 170,12 g/mol) (Polewski et al., 2002).



Şekil 1.2. Gallik asitin kimyasal formülü (URL, 2022b)

Gallik asit gibi birçok bitkisel etken maddenin farklı kanser türleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Xavier et al., 2009). Farklı farmakolojik ve biyokimyasal etkilere sahip olduğu bilinen gallik asit, güçlü antioksidan (Feinberg et al., 2002), anti-enflamatuar (Kroes et al., 1992), antimutajenik (Gichner et al., 1987) ve antikanser özellikler gösterir (Kaku et al., 1995). Gallik asit ayrıca metal iyonlarının varlığında konsantrasyona bağlı bir şekilde pro-oksidan özelliğe sahiptir. Gallik asidin pro-oksidan özelliği, kanser hücre dizilerinde apoptoz indükleyicisi olarak kabul edilmiştir (Yeni et al., 2002).

İlaç ile birlikte başka bir ilaç veya bitkisel etken madde kombinasyonunun kullanımı, birden fazla mekanizma veya yolağı etkileyerek tedaviyi daha etkin hale getirebilmektedir. Çeşitli bitkilerden elde edilen bileşik yapılar, fitokimyasal olarak adlandırılır. Bunlar, insan sağlığı üzerinde antikarsinojen, antimutajen, antiproliferatif, antioksidan ve antimikrobiyal olmak üzere çeşitli etkilere sahiptirler (Surh, 2003). Tamamlayıcı ve alternatif ilaç

yaklaşımları arasında yer alan bitkiler, kanser dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarını tedavi etmek için kullanılır. Bitkisel bazlı ilaçlar, düşük toksisite ve minimal düzeyde yeni kanser tedavileri için umut verici olabilir (Ahmad et al., 2017).

Bu çalışmanın amacı, küçük molekül PARP inhibitörü olarak klinik öncesi ve klinik araştırmalarda başarılı sonuçlar sağlayan olaparib ile bir bitkisel etken madde olan gallik asidin, *in vitro* kanser modeli olarak seçilen olaparib dirençli U2OS insan osteosarkoma hücrelerinde (U2OS-PIR), hücre çoğalması ve apoptoz üzerine olan sinerjistik etkilerini araştırmaktır. Çalışmalar kapsamında yapılan analizler sonucunda elde edilen bulgular ışığında, uygulanan tedavilerin moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması ve olaparibe karşı dirençli kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve antiproliferatif etkinlikleri ile daha az yan etkiye sahip yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünya geneline bakıldığında kanser büyüyen bir sağlık sorunudur ve kalp-damar hastalıklarından meydana gelen ölümlerden sonra ikinci en büyük ölüm sebebidir. 70 yaş ve öncesi ölümlere bakıldığında 183 ülkeden 112'sinde ilk yada ikinci sırada yer alırken, 23 ülkede üçüncü yada dördüncü sırada yer almaktadır. Dünya genelinde en sık görülen kanser tipleri sırasıyla meme kanseri (%11,7), akciğer kanseri (%11,4), kolorektal kanser (%10), prostat kanseri (%7,3) ve mide kanseridir (%5,6). Kanser kaynaklı ölüm oranlarında ise ilk sıralarda akciğer kanseri (%18), kolorektal kanser (%9,4), karaciğer kanseri (%8,3), mide kanseri (%7,7) ve meme kanseri (%6,9) yer almaktadır (Sung et al., 2021).

Kanser tedavileri arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapisi, bağışıklık terapisi ve hedefe yönelik terapi gibi özellikle kanser hücrelerinin büyümesini engelleyen ilaçlar yer almaktadır (Huang et al., 2009).

Geçtiğimiz yıllardaki kanserle mücadelede gösterilen çabalara ve edinilen başarılarla rağmen, klasik kemoterapötik ajanlara ve yeni hedefe yönelik ilaçlara direnç, kanser tedavilerinde ciddi bir problem olmaya devam etmektedir. Tedavi edilmeden önce var olan (içsel) ve tedaviden sonra (kazanılmış) oluşan ilaç direnci, kanserin nüksetmesine sebep olur. Hastalar ve tümörler arasındaki heterojenlik ve kanserin tedavi mekanizmasındaki çok yönlülüğü, ilaç direnciyle başa çıkmayı daha zor hale getirir. İlaçlara karşı oluşan bu direnç mekanizmasını daha iyi anlamak, kanserlerle mücadelede bize önemli ölçüde yol gösterici olabilir (Lippert et al., 2008).

İlaç direnci, kazanıldığı zamana göre içsel veya sonrada kazanılmış direnç olarak ayrılır. İçsel direnç, ilaç tedavisinden önce bulunurken, kazanılan direnç, tedaviden sonra meydana gelir. İçsel direnç genellikle, tedavi başlamadan önce var olup doğuştan gelmektedir ve genellikle ilaç tedavisinin etkinliğinin azalmasına neden olur (Kelderman et al., 2014). Kazanılmış direnç, ilaç tedavisinden sonra bir ilacın antikanser etkinliğinin kademeli olarak azalmasıyla tanımlanabilir. Sonradan ortaya çıkan ikinci proto-onkogenin aktivasyonu, ilaç hedeflerinin mutasyona uğraması veya değiştirilmiş ifade seviyeleri,

tedaviden sonra tümör mikroçevresindeki değişiklikler gibi faktörler direnç oluşmasına sebep olur (Quintás-Cardama et al., 2009).

Birden fazla ilaca, farklı kimyasal yapılara, farklı etki mekanizmalarına ve farklı hedeflere karşı eşzamanlı direnç gelişimi, çoklu ilaç direnci (MDR) olarak tanımlanır. Kanser tedavisinde kemoterapinin başarısız olmasının en önemli nedenlerinden birisi kanserli hücrelerin ilaca karşı geliştirdiği çoklu ilaç direncidir (Dallavalle et al., 2020). MDR, kanser hücrelerinin yapılarından ve etki mekanizmalarından bağımsız olarak antikanser ajanlara karşı aşamalı olarak tepkisiz hale geldiği bir süreçtir (Szakács et al., 2006).

Halihazırda piyasada bulunan tüm antikanser ilaçlarının %70'inden fazlası doğal ürünlerden üretilmiştir. Ayrıca, doğal bileşikler şu anda ilaç keşfinde çok önemli bir rol oynamaktadır. MDR ile mücadele yolları bulmak amacıyla incelenen birkaç doğal bileşik sınıfı vardır ve bunlar arasında flavonoidler, kurkuminler, alkaloidler, steroidler ve terpenoidler bulunur (Harvey et al., 2015).

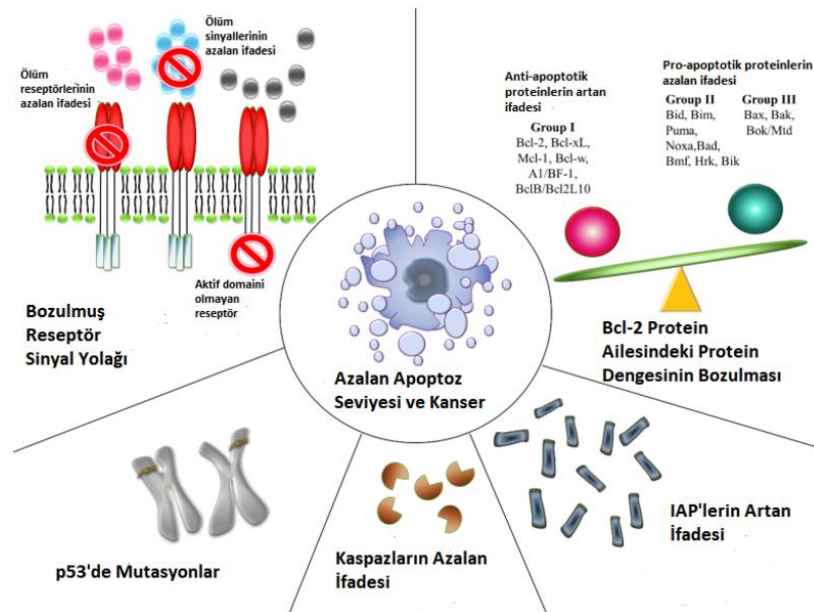
Son yıllarda, ilaç direncinin kazanılmasının altında yatan mekanizmalara ilişkin anlayışımızdaki gelişmeler, iyi tanımlanmış mekanizmaların üstesinden gelmeyi veya bunlara karşı koymayı amaçlayan yeni stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır (Assaraf et al., 2019). Bu stratejiler, kanserli hücrelerde meydana gelen MDR ile mücadelede tümör hücrelerinin hedefleme yeteneklerini arttırmak için şu anda aktif olan antitümör ilaçlarında modifikasyonların kullanılmasını kapsar (Wang et al., 2019).

Tek bir molekülün iki veya daha fazla ilgili kanser hücresi hedefiyle eşzamanlı etkileşimi, ilaç direncini aşmak için umut verici bir yaklaşımdır. Bu strateji, farklı ilaçların yapısal özelliklerinin yeni bir molekülde birleştirilmesiyle veya iki ilacın veya farmakoforum bölünebilir/ayrılmaz bağlayıcılar yoluyla konjuge edilmesiyle elde edilen hibrit bileşiklerin tasarımına dayanır. Olaparib gibi antikanser ilaçlar, apoptoza yol açabilen DNA tek zincir kırıklarına neden olur. Bu ilaca karşı oluşturulan direnç, genellikle hasarı tersine çevirmede rol oynayan birincil DNA onarım mekanizmaları olan nükleotid eksizyon onarımı ve homolog rekombinasyon sayesinde gerçekleşir (Housman et al., 2014). Hasarlı DNA'nın onarımının antikanser ilaç direncinde önemli bir rolü vardır. Doğrudan veya dolaylı olarak

DNA'ya zarar veren kemoterapi ilaçlarına yanıt olarak, DNA hasar yanıtı (DDR) mekanizmaları ilaca bağlı hasarı tersine çevirebilir (Bonanno et al., 2014).

Apoptoz, programlanmış bir hücre ölümüdür ve kanser tedavilerinde hücre ölümünün öncül mekanizmasıdır (Danial and Korsmeyer, 2004). Apoptozis, gelişme ve yaşlanma süresince dokulardaki hücre sayısını korumak için homeostatik olarak meydana gelir. Aynı zamanda immün reaksiyonlarda veya hücreler hastalık ve zararlı ajanlarla hasara uğradığı zaman bir savunma mekanizması olarak gerçekleşir (Norbury and Hickson, 2001).

Apoptozisi uyaran pek çok fizyolojik ve patolojik uyaran ve durum olmasına rağmen, aynı uyarılara cevap olarak dokudaki bütün hücrelerin ölümü gerçekleşmez. Kanser tedavisi için kullanılan radyoterapi veya ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olur ve bu hasar, p53'e bağlı bir yolakla hücreyi apoptotik ölüme yönlendirebilir (Elmore, 2007). Apoptoz ve kanser arasındaki ilişki Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Apoptoz ve kanser arasındaki ilişki (URL, 2022c)

Kanserle mücadelede temel hedef, kanserli hücrelerin apoptoz yoluyla etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasını destekleyen tedavilerin geliştirilmesi olmuştur. Bu sürece hücrel stres oluşması, DNA'da hasar meydana gelmesi ve bağışıklık gibi apoptoza yönlendiren sinyal yollarının tetiklenmesi hedeflenir. Apoptozun altında yatan mekanizmaların

keşfedilmelerinin yanı sıra, tümör ilerlemesini engelleyen çeşitli kinazların blokajı yoluyla, kanser için hedeflenen tedavilerin tanımlanmasında ilerleme kaydedilmiştir (Carneiro and El-Deiry, 2020).

Kanser hücrelerinin özelliklerinden biri de apoptoza karşı geliştirmiş olduğu dirençtir. Kanserli hücrelerin apoptozdan kaçınması, tümörün ilerlemesine neden olur. Bununla beraber tedaviye karşı bir direnç mekanizması oluşturulmuş olur, çünkü kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi dahil olmak üzere çoğu kanser tedavisi, öncelikle kanser hücrelerinde apoptoz gibi hücre ölüm yollarını aktive eder. Bu nedenle, apoptotik hücre ölümüne dayanan tümör direncinin altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması oldukça önemlidir (Fulda, 2009).

Apoptozu başlatan içsel (mitokondriyal) uyarı yolları, hücrenin içerisindeki hedeflere doğrudan etki eder ve mitokondriyal yolla başlatılmış hücrenin içerisindeki sinyaller üreten uyarıyı oluşturur. BCL-2 ailesi, dış mitokondriyal membranın bütünlüğünü etkileyerek mitokondriyal apoptotik yolu düzenler (Green and Evan, 2002). BCL-2 ve BAX, sırasıyla apoptoz anti apoptozu ve apoptozun tanıtımının kilit rol oynayan iki ana proteindir. Ayrıca, parçalanmış kaspaz-3, hücre apoptozunu indükleyen apoptozun aşağı akış proteindir (Llambi et al., 2011). İçsel yolu aktif hale getiren sinyaller, iki yönde hareket eden hücre iç sinyalleri üretir. Negatif yönlü sinyaller, belirli büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunu içerir ve bu da ölüm yollarının baskılanmasında başarısızlığa yol açarak apoptozu tetikler (Saelens et al., 2004).

İkinci bir apoptoz yolu olan dışsal sinyal yolları, ölüm reseptörleri olarak bilinen hücre zarı proteinleri tarafından başlatılır. Hücre yüzeyindeki TNF α (tümör nekrozis faktör- α), Fas (CD95/APO1) ve TRAIL (TNF ilişkili apoptozis indükleyici ligand) gibi ölüm reseptörleri aracılığıyla ekstrinsik bir uyarıya apoptozu tetikler (Kroemer et al., 2007).

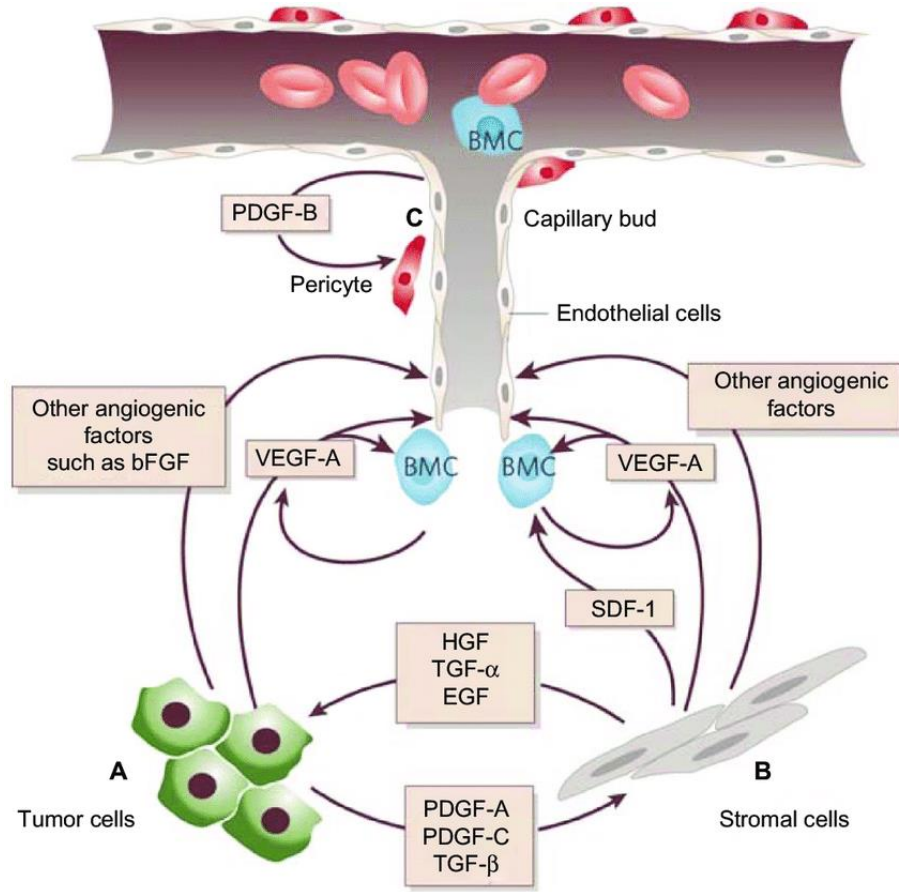
Normal hücre büyümesi, hücrenin biyosentetik mekanizması olan protein sentezi ve organel biyogenezi ile parçalayıcı süreçlerini içeren protein bozulması ve organel dönüşümü arasında iyi koordine edilmiş bir denge gerektirir (Lenz, 2003).

Kılcal damarların önceden var olan kan damarlarından filizlendiği süreç olan anjiyogenez, çok sayıda proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktör tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Tümör hücrelerinin, büyümelerini beslemek ve metastazı kolaylaştırmak için sürekli olarak yeni kan damarları kaynağına mutlak bir gereksinim duyar. Bu nedenle, tümör vaskülarizasyonu, bir neoplazmın küçük lokalize bir tümörden metastaz yapma kabiliyetine sahip büyüyen bir tümöre ilerlemesi için hayati bir süreçtir (Folkman, 1971).

Anjiyogenez süreci, tümör hücrelerinin istilası için gerekli olanlara paralel olan üç adıma bölünebilir: ilk adım endotel hücrelerinin çoğalması, ikinci adım hücre dışı matrisin parçalanması ve üçüncü adım endotel hücrelerinin göçüdür (Denijn and Ruiters, 1993).

Tümör vaskülarizasyonuna yol açan anjiyojenik kaskad, iki genel faza ayrılabilir, prevasküler faz ve vasküler faz. Tümör hücreleri bir kez anjiyojenik fenotipe dönüşüme uğradığında, bu malign hücreler, diğer hücre tiplerinde olduğu kadar endotel hücrelerde de fenotipik değişiklikleri indükleyebilir (Hanahan and Folkman, 1996). Bu noktada, avasküler tümörler, hızlı bir büyüme oranına izin veren kendi kan kaynaklarını elde edebilirler. Yeterli vaskülatürden yoksun tümörler nekrotik veya apoptotik olurken, neovaskülarizasyona uğramış tümörler sadece hızlı büyüme fazına girmekle kalmaz, aynı zamanda artmış metastatik potansiyele de sahip olabilir (Holmgren et al., 1995).

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ailesi altı üye içerir: VEGF, plasenta büyüme faktörü, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E (Neufeld et al., 1999). Bunlar dimerik glikoproteinler olarak salgılanır ve tümü "sistein düğümü" motifi olarak adlandırılan karakteristik düzenli aralıklı sekiz sistein kalıntılarını içerir (Pötgens et al., 1994). Bu glikoproteinler, aynı zamanda PDGF-BB ve TGF- β 2'yi de içeren büyüme faktörlerinin yapısal bir süper ailesine aittir (McDonald and Hendrickson, 1993). Tomao ve arkadaşları (2014) VEGF oluşumunu Şekil 2.2'deki gibi açıklamıştır.



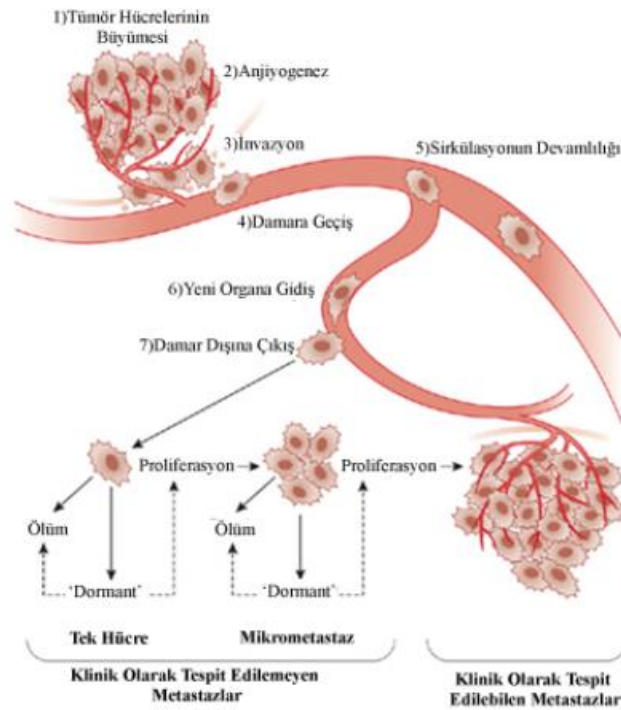
Şekil 2.2. VEGF oluşumu (Tomao et al., 2014)

Bilinen en güçlü doğrudan etkili anjiyojenik protein olan VEGF, damar geçirgenliğini de artıran, yayılabilir bir endotel hücreye özgü mitojen ve anjiyojenik faktördür. Yeni oluşan damarlarda endotel hücre sağkalımı VEGF'ye bağlıdır (Connolly et al., 1989). VEGF aşırı üretimi, sedef hastalığı, makula dejenerasyonu ve tümör proliferasyonu gibi durumlarda *in vivo* patolojik anjiyogenezin altında yatan ana faktör olarak tanımlanır (Bell et al., 1999).

VEGF mRNA'nın transkripsiyonu, Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), Epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), Dönüştürücü büyüme faktörü beta-1 (TGF- β 1) ve interlökin 1-beta (IL-1 β) dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından da indüklenir. VEGF, anjiyogenezin parakrin stimülasyonundaki rolüne ek olarak, tümör hücreleri üzerinde otokrin uyarıcı bir etkiye de sahip olabilir (Liu et al., 1995). Büyüyen tümör ve stromal doku tarafından hipoksi aracılı transkripsiyon ve faktör salgılanmasının ilk olayı, büyüme faktörü reseptörlerinin bir upregülasyonuna ve

aktivasyonuna yol açar. Bu, endotelial filizlenme, artan vasküler geçirgenlik, doku matrisi metalloproteinazlarının (MMP'ler) ekspresyonu ve nihayetinde endotel hücresinin hareket etmesi için gerekli olan matrisin sindirimi ile sonuçlanır. Artan endotel hücre mitogenezi ve diğer faktörlerin yayılması ve aktivasyonu, perisitler gibi diğer destekleyici hücreler de dahil olmak üzere endotel hücrelerinin oluşumuna ve hareketine yol açar ve sonunda damar genişlemesine, artan kılcal bütünlüğüne, mikrodamar destek hücrelerinin farklılaşmasına ve oluşumuna yol açar (Benjamin and Keshet, 1997).

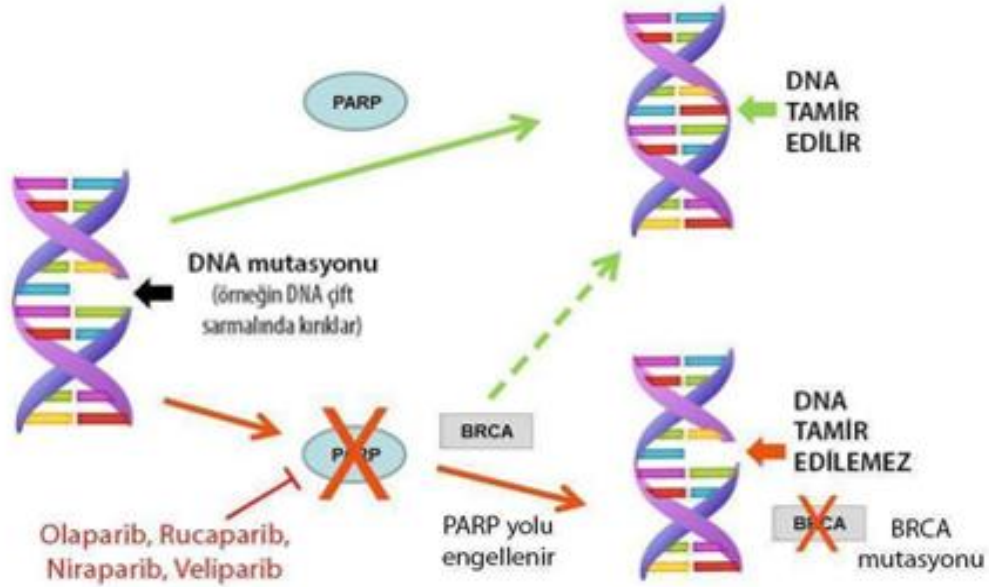
Tümör metastazı kanser hastalarında önde gelen ölüm nedenidir. Metastaz, bir tümör hücresinin birincil tümörü terk etmesi, dolaşım sistemi yoluyla uzak bir bölgeye gitmesi ve ikincil bir tümör oluşturması sürecidir (Hunter et al., 2008). Bir tümör hücresinin istila etmesi ve metastaz yapması için gerekli olan genetik ve moleküler adımların daha derinden anlaşılması, yeni teşhis ve tedavi stratejileri için başlangıç noktasıdır. Kan damarlarının oluşumu (anjyogenez), birincil tümörün büyümesi için önemli bir adımdır. Zengin vaskülarizasyon, tümör hücrelerinin kan dolaşımına ulaşma ve buna bağlı olarak ikincil bölgeleri kolonize etme şansını artırır. Şekil 2.3'te metastaz oluşum şeması gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Metastaz oluşum şeması (McGee et al., 2006; Dilmaç, 2014)

Kemik, üçüncü en yaygın metastaz bölgesidir. Göğüs, prostat ve akciğer dahil olmak üzere belirli tümörler sıklıkla kemiğe metastaz yapar. Aslında meme kanserinden ölen hastaların %90'ında kemik metastazı vardır (Mundy and Yoneda, 1995).

Olaparib, PARP'ı DNA hasarı bölgesinde yakalayıp baz eksizyon onarımını bloke eden, böylece DNA replikasyon çatallarının çökmesine ve DNA çift sarmallı kopmaların birikmesine neden olan oral (poli / ADP riboz) polimeraz inhibitörüdür. Olaparib, öncelikle onarılmamış tek zincir kırıklarına (SSB) yol açan BER yoluna müdahale eden PARP (poli ADP-riboz polimeraz) inhibitörleri adı verilen yeni bir ilaç sınıfını temsil eder (Bochum et al., 2018). PARP inhibitörlerinin etki mekanizması Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. PARP inhibitörlerinin etki mekanizması (URL, 2022d)

Poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP-1), tüm yüksek ökaryotların çekirdeklerinde bulunan, oldukça bol kromatin ile ilişkili bir proteindir. NAD^+ 'dan türetilen oldukça negatif yüklü, dallı zincirli bir post-translasyonel modifikasyon olan poli (ADP-riboz) (PAR) ile çok çeşitli hedef proteinleri değiştiren bir enzim ailesinin kurucu üyesidir (D'amours et al., 1999). PARP ailesinin kurucu üyesi olan poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1), onu hem yapısal hem de düzenleyici roller için çok uygun kılan bir dizi farklı biyokimyasal aktiviteye sahiptir PARP (poli [ADP-riboz] polimeraz), DNA'da oluşan tek

zincir kırıklarının baz eksizyon tamir (BER) mekanizması ile onarılması dâhil birçok hücrel mekanizmada rol oynayan önemli bir enzimdir (Vermoortele et al., 2012). PARP protein ailesi, ART (ADP-ribosil transferaz) protein grubu altında sınıflandırılan 17 adet enzimden oluşmaktadır. ART enzimleri, “PARilasyon” olarak adlandırılan ve PAR (ADP-riboz polimerleri) ünitelerinin oluşturulması ve spesifik amino asit bölgeleri vasıtasıyla akseptör proteinlere kovalent olarak eklenmesi amacıyla β -NAD⁺ (beta nikotinamid adenin dinükleotid)’den ADP-riboz moleküllerini transfer edebilme kapasitesine sahiptir (Vermoortele et al., 2012). Böylece, ilgili DNA tamir mekanizmasında rol oynayan kilit proteinlerin hasarlı kromatin bölgesinde toplanması PARP enzimlerinin gerçekleştirdiği post-translasyonel modifikasyon ile icra edilmiş olur (Drean et al., 2016). Özellikle hücre döngüsünün S/G2 fazında oluşan DNA çift zincir kırıklarının tamirinden sorumlu olan homolog rekombinasyon (HR) mekanizmasının (Goodarzi and Jeggo, 2013) tam olarak çalışmadığı hücreler, PARP inhibisyonuna karşı yüksek duyarlılık göstermektedir (Kangas et al., 2005; Farmer, 2005). Tam olarak fonksiyonel bir HR mekanizmasına sahip olmayan homozigot BRCA1/2 mutasyonuna sahip kanserli hücreler, heterozigot veya normal BRCA1/2 allellere sahip hücrelere kıyasla PARP inhibisyonuna karşı yüksek sensitivite göstermektedirler (Kangas et al., 2005). PARP inhibisyonu nedeniyle biriken DNA tek zincir kırıkları, özellikle DNA sentezinin yaşandığı hücre döngüsünün S fazında büyük oranda HR sistemi ile onarılan DNA çift zincir kırıklarına dönüşür ve sonrasında kontrollü hücre ölümü gerçekleşir (Petermann et al., 2010; Lord and Ashworth, 2016). Son yıllarda, özellikle klinikte kullanılmakta olan küçük molekül PARP inhibitörü olaparibin antineoplastik etkisini arttıracak faktörlerin tanımlanması dolayısıyla zamanla oluşan ilaç direncine karşı daha fazla hastanın PARP inhibitör ilaçlarıyla başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesi üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

Olaparib, PARP’ı DNA hasarı bölgesinde yakalayıp baz eksizyon onarımını bloke eden, böylece DNA replikasyon çatallarının çökmesine ve DNA çift sarmallı kopmaların birikmesine neden olan oral (poli / ADP riboz) polimeraz inhibitörüdür. Olaparib, öncelikle onarılmamış tek zincir kırıklarına (SSB) yol açan BER yoluna müdahale eden PARP (poli ADP-riboz polimeraz) inhibitörleri adı verilen yeni bir ilaç sınıfını temsil eder (Kangas et al., 2005).

DNA replikasyonu sırasında kalıcı SSB'ler, daha sonra HR ile onarılan DSB'lere dönüştürülür. Bununla birlikte, HR eksikliği olan hücrelerde (örn., BRCA1/2'nin fonksiyon kaybı yoluyla), PARP'nin eşzamanlı inhibisyonu, organizma veya hücrel ölümüne yol açan iki genetik olayın birlikte ortaya çıkmasıyla tanımlanan bir süreç olan sentetik ölümcüllüğü indükler (Kangas et al., 2005).

Bitkilerden elde edilen doğal bileşikler antikanser potansiyele sahiptirler ve kemoterapötik ilaçlarla kombine olarak kullanıldıklarında onların etkinliklerini arttırmırlar. Çoğu doğal bileşik hücrel sinyal iletiminde birden fazla hedefe etki eder. Bu yüzden doğal bileşiklerle ilgili geniş ölçüde çalışmalar yapılmaktadır (Erdoğan, 2016). Tıbbi bitkiler kanserin de dahil olduğu pek çok hastalığın tedavisinde toksisiteye neden olmadıkları için kullanılmaktadır. Kanserde birçok bitkisel etken maddenin çeşitli sinyal yolları üzerindeki etkisi bilinmektedir. Gen ekspresyon çalışmaları hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesinin yanı sıra, MAPK sinyal yolları ile ilgili genlerin üzerindeki bitkisel etken maddelerin etkisini göstermektedir. Proteomik çalışmalar, Akt inhibisyonu ve MAP kinazların seviyelerinin düzenlenmesinde bu rollerini ortaya koymaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, p53'e bağlı olarak p38 MAPK seviyesinin yukarı yönlü regüle edildiği ve bu şekilde apoptozisin inkübe edildiği gösterilmiştir (Erdoğan, 2016).

Gallik asit, farklı moleküler seviyelerde çeşitli tümör tipleri üzerinde farklı etkilere sahiptir. Kansere karşı etkileri, bu bileşiği terapötik kullanımlar için önemli bir biyomolekül haline getirir. Gallik asit, kanserli hücreler için seçici sitotoksikite göstermiştir ve normal hücreler için çok daha az toksisiteye sahiptir (Chia et al., 2010). Bu özellik, gallik asidi kanser tedavisinde besin takviyeleri olarak değerli bir katkı maddesi yapar (Verma et al., 2013). Çalışmalar ayrıca kimyasal kaynaklı indüklenen karsinogenezde gallik asidin koruyucu etkisini doğrulamıştır (Senapathy et al., 2011).

Gallik asidin kanser tedavisinde neoplastik bir etkiye sahip olduğuna dair günümüzde pek çok çalışmaya ulaşmak mümkündür (Zhang et al., 2019). Farklı hücre hatları üzerinde etkili olabildiğini gösteren çalışmalar, gallik asidin kanser tedavisinde etkin bir fenol bileşik olabileceği umudunu vermektedir. Ayrıca çeşitli kanser ilaçlarıyla sinerjik etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Doğrul et al., 2016). Kalsiyum kanallarının aktivasyonunu düşürdüğü, p53 yolağının aktivasyonunu arttırarak apoptoz yolağını

tetiklediği yapılan çalışmalar arasında yerini almıştır (Yang et al., 2018). Bu açıdan gallik aside baktığımızda meme kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri gibi pek çok kanser türünde tedavi amaçlı uygulandığında etkili sonuçlar alınmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmalarda U2OS insan osteosarkoma hücre hattı ve olaparibe karşı direnç geliştirilmiş U2OS hücreleri (U2OS-PIR) kullanıldı. Tez çalışması kapsamında tüm hücre kültürü çalışmaları Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Kanser Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve kullanılan tüm kimyasal ve sarf malzemeler ile kitler ticari olarak satın alındı. Analizlerde kullanılan materyaller: Olaparib (MedChem); Gallik asit (Sigma-Aldrich); cPARP, Bax, Bcl-2, Cas-9, p53 ve p21 antikorları (Santa Cruz); DMEM, Penisilin/Streptomisin, FBS, Tripsin-EDTA, DPBS (Gibco); Tris HCl, DMSO, Tween-20, Bromfenol mavisi, β -merkaptotanol, NP-40, EDTA, EGTA, β -gliserofosfat, H₂O₂, NaOH, glisin (Merck); tripan mavisi, TEMED, Tris, KCl, NaCl, HCl, NaF, Na₃VO₄, Commasie blue-G250, NaN₃, luminol, yağsız süt tozu, Ponceau S, H₃PO₄, p-kumarik asit, PMSF, DTT, benzamidin, etanol, gliserin, gliserol, sodyum dodesil sülfat (Sigma-Aldrich); 0,45 μ m PVDF membran (Millipore); mikrosantrifüj tüpleri, 15 ve 50 mL'lik Eppendorf tüpleri (Isolab); 25 ve 75 cm² hücre kültürü flaskları (Sarstedt); 6 ve 96 kuyucuklu mikrolakalar (Corning); 5-10-25 mL steril pipetler ve plastik pipet uçları, 3 ve 6 cm petri kapları (Costar) şeklindedir. Ayrıca çalışmalarda üretici protokollerine uygun olacak şekilde WST-1 hücre proliferasyonu ve sitotoksosite test kiti (Boster) ve insan vasküler endotel hücre büyüme faktörü A (VEGF-A) ELISA kiti (YL Biotech) kullanıldı. Tüm reaktif, çözücü ve örnekler analitik grade olacak şekilde hazırlandı ve uygun koşullarda alikotlanarak saklandı (Buzdolabı 2-8 °C / SEG, Derin Dondurucu -20 °C / Vestel, Derin Dondurucu -86 °C / Nuair Glacier NU-9668GC).

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

U2OS parental ve U2OS-PIR hücreleri, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren yüksek glukozlu DMEM besiyerinde 37 °C'de, %95 nem ve %5-6

CO₂'li ortamda kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücreler her gün kontrol edilerek besiyerleri yenilendi. %80 oranında yoğunluğa ulaştıkları zaman hücreler tripsin uygulanarak kaldırıldı ve ardından pasajlandı. Hücre kültürü flaskları içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve kapların içerisi PBS ile iki kez yıkandı. Daha sonra Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi, flasklar 3 dk inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında, hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrıldığı görüldü ve laminar flow kabini içerisinde flasklara tripsin çözeltisinin iki katı kadar besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu steril pipetler kullanılarak flaskların içerisinden çekilip, içerisinde 3 mL besiyeri bulunan 15 mL'lik eppendorf tüplerine aktarıldı. Bu tüpler 2500 rpm'de 4 dk santrifüjlendi ve süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 5 mL besiyeri eklenip birkaç kez pipet ile alınıp tekrar bırakılarak homojen bir karışım elde edildi. Karışımında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı ve içinde 8 mL besiyeri bulunan flasklara hücre süspansiyonu pipetlendi. Stok olarak saklanması için, 15 mL'lik eppendorf tüplerinden bazılarındaki hücre peletlerinin üzerine freezing medyum (%95 FBS + %5 DMSO) eklenip homojen şekilde karışması sağlandı. Karışım dondurma tüplerine konularak önce bir gece -86 °C'de bekletilip ertesi gün sıvı azot tankına (-196 °C) kaldırıldı (Erdoğan, 2016). Hücre kültürü çalışmalarında, parental U2OS ve olaparib dirençli U2OS hücrelerine gallik asit (monoterapi), olaparib (monoterapi) veya gallik asit + olaparib (kombo-terapi) tedavileri 72 saat boyunca uygulandı. Kontrol grubu olan hücreler ise sadece besiyeri+DMSO karışımı ile muamele edildi.

3.2.2. Olaparib ve Gallik Asit Stoklarının Hazırlanması

Olaparib ve gallik asit ticari olarak satın alındı ve ana stoklar hazırlandı. Çalışmalarda kullanılan olaparib (MA: 434,46 g/mol) 10 mM stok konsantrasyonu ile DMSO içinde çözüldü, 20 µL alikotlara ayrıldı ve -80 °C' de saklandı. Gallik asit (170,12 g/mol) ise 20 mM olacak şekilde DMSO ile çözümlenerek hazırlandı ve 20 µL alikotlarla -80 °C' de saklandı. Her deney için, ana stoktan taze olacak şekilde -80 °C' den çıkarıldı ve çalışma konsantrasyonları hücre kültürü ortamında hazırlandı.

3.2.3. Olaparib Dirençli U2OS Hücrelerinin Oluşturulması

PARP inhibitörü olaparibe dirençli U2OS hücre klonları, literatür araştırmasına göre belirlenen olaparib IC₅₀ dozları ile tedavi edilerek oluşturuldu. Sürekli seçim tekniği ile

ilgili deney setleri gerçekleştirildi (Edwards et al., 2008). 60 mm hücre kültürü kaplarına ekilen hücreler, bir hafta boyunca ilk doz 1 μM olacak şekilde olaparib ile tedaviye tabi tutuldu. U2OS hücreleri kültür kaplarından toplandı ve sayıldı. 2×10^5 hücre 60 mm hücre kültürü kaplarına ekildi. Hücreler, 24 saat inkübatörde bekletilerek kapların yüzeyine bağlanmasına izin verildi. Ertesi gün, hücreler, olaparib 1 μM olaparib ile 5 gün boyunca tedavi edildi. 5 gün sonra, U2OS hücreleri pasajlandı ve artan dozlarda olaparib ile tedavi sürecine devam edildi. Her beş günde bir olaparib konsantrasyonunun artırılması, PARP inhibitörü olaparibe dirençli bir U2OS/PIR hücre hattının elde edilmesi ile sonuçlandı. Çalışmalarda kullanılmak üzere elde edilen U2OS/PIR hücreleri $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ' de saklandı.

3.2.4. Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığı WST-1 testi ile belirlendi. 96 kuyucuklu mikrolaplara 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) parental ve olaparib dirençli U2OS hücreleri ekildi. Bir gecelik inkübasyon süresinin ardından artan konsantrasyonlarda gallik asit ve olaparib tedavileri tek ya da kombine olarak (gallik asit 0-500 μM , olaparib 0-10 μM ve 0-100 μM , kombine tedavide GA IC25 + artan OL konsantrasyonu veya OL IC25 + artan GA konsantrasyonu) uygulandı. Ardından hücreler 72 saat boyunca inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak yalnızca DMEM + DMSO ortamı içerisinde bekletilen hücreler kullanıldı. Ardından kuyucuklardaki ilaçlı mediumlar uzaklaştırıldı ve kuyucuklara taze mediumlar eklendi. Kuyucuklara 10 μL WST-1 reaktifi eklenerek $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de yaklaşık 3 saat süreyle karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklarda meydana gelen renk değişimi spektrofotometrede (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices) 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Okunan absorbans değerlerinden, background kontrol (hücre içermeyen kuyucuktaki DMEM + WST-1 reaktifi kullanılarak hazırlanan) değerleri çıkarıldı. Tedavi uygulanan hücrelerdeki canlılık değerleri, tedavi uygulanmamış pozitif kontroldeki hücrelerle kıyaslanarak hesaplandı. Elde edilen verilerle hücrelerin % canlılık oranları belirlendi. Daha sonra bu veriler kullanılarak olaparib ve gallik asitin IC50 konsantrasyonları GraphPad Prism 8,1 programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.5. Sinerjizmin Belirlenmesi

U2OS parental ve U2OS-PIR hücrelerinde gallik asit ile olaparib tedavisi arasındaki sinerjizmin belirlenmesi için kombinasyon indeksi (KI) hesaplandı. Bir ilaç ve bitkisel bir bileşik arasında bu hesaplama sonucunda; $KI > 1$ ise antagonizm, $KI = 1$ ise güçlendirici (aditif) ve $KI < 1$ ise sinerjizm olduğu anlamını taşır (Chou 2006). Kombinasyon indeksinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı (Li vd. 2017);

$$KI = (A_{OL})_{50} / (B_{OL})_{50} + (A_{GA})_{50} / (B_{GA})_{50} \quad (3.1)$$

Bu formülde; $(A_{OL})_{50}$: GA'in IC50 konsantrasyonunun yarısı uygulandığında (IC25) hücre canlılığını %50'ye indiren OL konsantrasyonunu; $(B_{OL})_{50}$: OL'in IC50 konsantrasyonunu; $(A_{GA})_{50}$: OL'in IC50 konsantrasyonunun yarısı uygulandığında (IC25) hücre canlılığını %50'ye indiren GA konsantrasyonunu; $(B_{GA})_{50}$: GA'in IC50 konsantrasyonunu, ifade etmektedir.

3.2.6. Koloni Sağkalımı Deneyi

Koloni sağkalımı deneyi, farklı tedavilerin hücrelerin koloni oluşumunu azaltma etkisini belirlemek için gerçekleştirildi. Bu deney için, 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5×10^2 hücre olacak şekilde parental U2OS ve U2OS-PIR hücreleri ekildi. Ertesi gün, hücreler 72 saat boyunca GA ve OL ile mono- ve kombine-tedaviyle muamele edildi ve ardından besiyeri uzaklaştırılıp taze besiyerinde hücreler 12 gün boyunca inkübe edildi (%5 CO₂ ve %95 nem ile 37 °C). Bu süreden sonra, besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkanıp, metanol: aseton (3:1) ile fikse edildi ve 20 dakika boyunca kristal viyole ile boyandı. Daha sonra, oluşan koloniler incelendi.

3.2.7. Wound Healing Analizi

U2OS-PIR hücrelerinin hücre göç kapasitesini belirlemek için *in vitro* yara iyileşme analizi yapıldı (Erdogan et al., 2021). 5×10^5 hücre 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekildi ve %80-90 yoğunlukta tek katlı hücre tabakası oluşumundan sonra steril bir pipet ucu ile yüzeyde lineer bir çizik açıldı. Yüzeyden ayrılan hücreler PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve hücreler 24 saat boyunca OL (IC50), GA (IC50) ve OL (IC25) + GA (IC25) ile mono-ve

kombine- tedavi edildi. Yara kapanmasını değerlendirmek için 0., 12. ve 24. saatlerde çizik genişliği kontrol edildi ve görüntüler invert mikroskop (Olympus CKX 41) ile kaydedildi. Elde edilen görüntüler Image J yazılımı ile analiz edildi. Yara kapanması, her tedavi grubunun 0, 12 ve 24 saatlik görüntülerinin kontrol ile normalize edilmesi ve karşılaştırılması ile değerlendirildi.

3.2.8. Apoptozun Morfolojik Olarak İncelenmesi

Akridin oranj (AO) boyası yalnızca canlı olan hücrelerin zarından içeriye girer ve bu hücrelerin DNA'sına bağlanarak canlı hücreleri yeşil renkli gösterir. Ancak hem akridin oranj boyası hem de etidyum bromür (EB) boyası apoptotik hücre zarının içerisine girebildiğinden kırmızı-turuncu renk ve karakteristik apoptotik nükleus görüntüsünün görüntülenmesine imkan verir. U2OS-PIR hücreleri 72 saat süreyle olaparib (IC50 dozu), gallik asit (IC50 dozu) ve kombine olarak (olaparib IC25 + gallik asit IC25) tedavi edildi. Daha sonra mediumlar tazelenerek kuyucuklara 100 µg/mL konsantrasyonda akridin oranj/etidyum bromür karışımı eklendi ve canlı ve apoptotik hücre sayılarının birbirlerine oranlarının belirlenmesi için floresan ataçmanlı invert mikroskop (Olympus CKX 41) ile hücreler görüntülendi.

3.2.9. Anti-anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), kanser oluşumundaki anjiyogenезin dikkate alınması gereken bir düzenleyicisi konumundadır. İnsan VEGF (Hu VEGF) Elisa yöntemi, VEGF miktarlarını kantitatif şekilde belirleyebilmek amacıyla kullanıldı. 96 kuyucuklu olan mikropakanın kuyucuklarına 1×10^4 U2OS-PIR hücreleri ekildi ve standart şartlar altında bir gece boyunca inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 72 saat boyunca OL (IC50), GA (IC50) ve OL (IC25) + GA (IC25) ile mono-ve kombine- tedavi edildi. Besiyerleri ortamdaki uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS yardımıyla yıkayıp kazıyıcı yardımıyla toplanarak 50 µL miktarında taze besiyeri eklenmiş olan tüplere alındı. 50 µL inkübasyon tamponunu, tedavi edilen hücreleri içeren 50 µL besiyeri ve 50 µL standart seyreltici tampon, 8 kuyucuklu şerit plakaların kuyucuklarına eklendi. Oda sıcaklığında 2 saat süren inkübasyondan sonra, kuyucuklara 4 sefer yıkama tampon ile yıkama yapıldı ve 100 µL Hu-VEGF biyotin konjugat çözeltisi eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe

edildi. Sonrasında bu çözeltiler uzaklaştırılarak kuyucuklar tekrar 4 sefer yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından kuyucuklara 100 µL streptavidin-HRP eklenip oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında çözeltiler bu kuyucuklardan aspire edildi ve kuyucuklar 4 kez 1 X yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından kuyucuklara 100 µL stabilize kromojen çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Çözeltiler uzaklaştırılarak kuyucukların içerisine 100 µL durdurma çözeltisi (stop solution) ilave edildi. Homojenizasyon gerçekleştirildikten sonrasında, kuyucuklarda bulunan çözeltilerin gösterdikleri renk mavi tonlarından sarı tonlarına dönüştü. 2 saat inkübasyon süresinin ardından 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusu ile absorbanlar ölçüldü. Tüm çalışmalar için standart eğri grafiği oluşturuldu ve sonuçlar standart eğri ile kıyaslanarak her tedavi grubu için VEGF miktarı kontrol grubu ile kıyaslandı.

3.2.10. Western Blot ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi

U2OS-PIR hücrelerindeki DNA hasarı ve apoptoz ile ilişkili proteinlerin tedaviye bağlı ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için toplam protein içerikleri özütlenerek hedeflenen proteinlerin ifade düzeyleri Western blot tekniği ile belirlendi. 72 saat boyunca OL (IC50), GA (IC50) ve OL (IC25) + GA (IC25) ile mono-ve kombine- tedavi edilen U2OS-PIR hücrelerinin ekildiği kültür kuyucukları öncelikle soğuk 1X PBS tamponuyla iki kez yıkandı. Proteinlerin pürifikasyonu için içerisinde 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, NP-40 0,5%, (v/v), 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT, proteaz inhibitörü koktail (complete EDTA-free) bulunan standart lizis tamponu kullanıldı. Kazıyıcı yardımı ile toplanan hücreler, 1X PBS tampon ile süspansiyon edildikten sonra 1.100 rpm'de 10 dakika süresince santrifüj yapıldı ve süpernatantdaki kısmi aspiratör yardımıyla alındı. Elde edilen pelet yeterli miktarda (5×10^5 hücre için 100 µL) lizis tamponu ile yeniden süspansiyon edildi ve süspansiyon esnasında 1 mL'lik enjektörler kullanılarak etkin bir homojenizasyon ve protein eldesi sağlandı. 45 ila 60 dakika buzun üzerinde bekletildi ve sonra örnekler 10 dakika süresince, 15000 rpm'de ve 4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant yeni bir mikro-santrifüj tüpüne aktarıldı. Bradford metodu kullanılarak örneklerdeki protein konsantrasyonları belirlendi. Protein örnekleri uygun konsantrasyonlarda SDS-PAGE jel ile ayrıldı. Daha sonra PVDF (poliviniliden florür) membranına transfer edilip ve transfer sonrası bloklama tamponunda (%5'lik BSA) inkübe edildi. Bloklamanın ardından membranlar gece boyunca ilgili primer antikoru ile 4 °C'de inkübasyonu sağlandı. 1X T-

BST kullanılarak membran yıkama aşaması tamamlandıktan sonra HRP ile işaretli sekonder antikor ile inkübe edildi (Tablo 3.1). Membran 1X T-BST ile yeniden yıkandı. Görüntüleme için kemilüminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanıldı. Kemilüminesans görüntü X-ray görüntüleme sistemi kullanılarak filme aktararak elde edildi. Son olarak bantta görülen yoğunluklar Image-J programı yardımıyla dansitometrik olarak değerlendirildi.

Tablo 3.1. Western blot analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyon oranları

Primer antikor	Dilüsyon oranı	Sekonder antikor	Dilüsyon oranı
cPARP	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:5000
Bax	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:5000
Bcl-2	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:5000
Cas-9	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:5000
p53	1:1000	Goat anti mouse IG-g HRP	1:5000
p21	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:5000
Tubulin	1:100	Goat anti mouse IG-g HRP	1:5000

3.2.11. İstatistiksel Analizler

Deneyler sonucunda elde edilen bulgular, en az üç deneyin ortalama \pm standart sapması (SD) olarak ifade edildi. Kontrol ve tedavi grupları arasında yapılan kıyaslamalar, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 8,1 programı kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlılık değeri olarak kabul edildi.

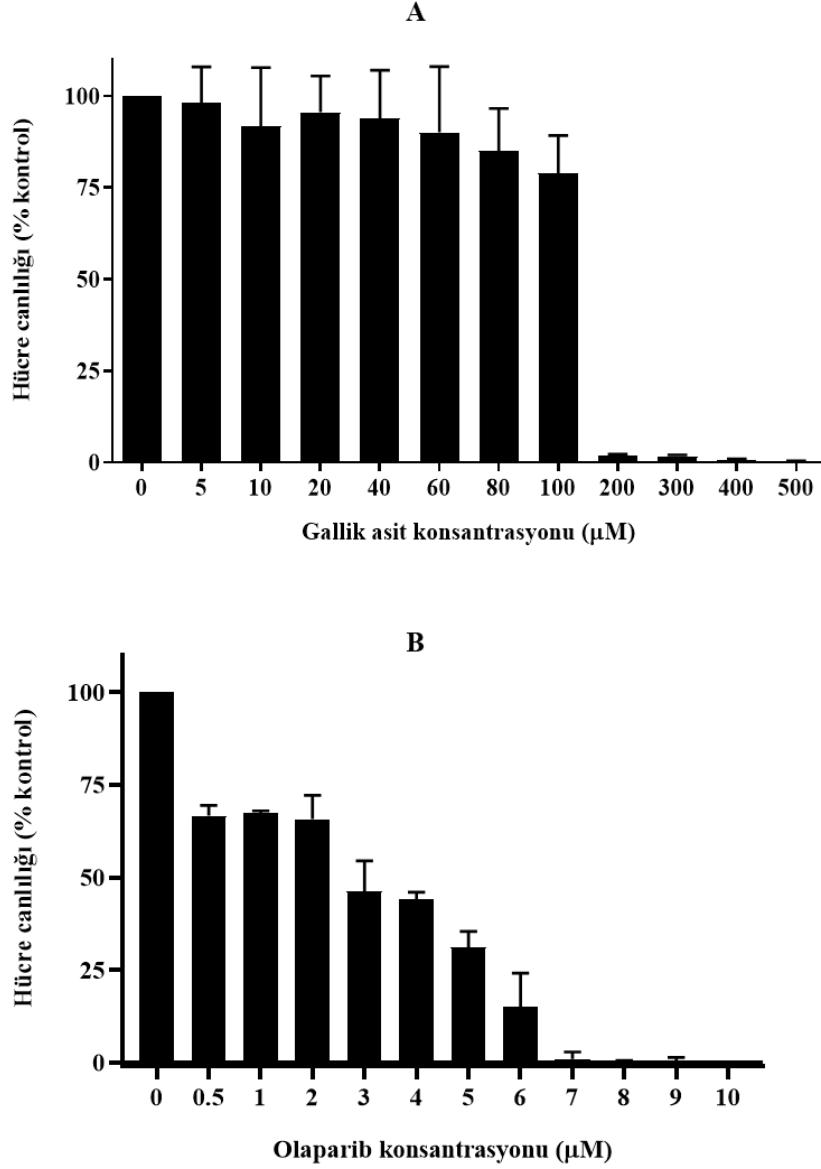
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sitotoksisite ve Kombinasyon İndeksi Bulguları

Kanser, küresel ölçekte en yüksek ölüm oranına sahip hastalıklardan birisidir ve dünya genelinde kanserle mücadele için büyük çaba harcanmaktadır. 2005 ve 2018 yılları arasında, kanser ilerlemesini etkili bir şekilde engelleyen hedefe yönelik tedaviler de dahil olmak üzere, insan malignitelerini tedavi etmek için 1100'den fazla antikanser ilacı geliştirilmiştir (Chen et al., 2021). Ancak bu ilaçların kullanımını sınırlayacak kaçınılmaz birçok ciddi yan etkisi vardır. Özellikle uzun süreli tedavi durumunda, hastalarda tedavi sırasında çoklu ilaç direnci (MDR) gelişebilir. Bu noktada doğal bileşikler ve bitkisel etken maddelerin kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyeli büyük ilgi görmektedir. Çok sayıda çalışma, standart kemoterapötik ilaçlarla karşılaştırıldığında, bitkisel etken maddelerin ve doğal bileşiklerin tümör oluşumunu engellemede, sağkalım süresini uzatmada, kemoterapi ve radyoterapinin yan etkilerini azaltmada ve kanser hastalarının yaşam kalitesini iyileştirmede yararlı ve etkili olduğunu kanıtlamıştır (Newman ve Cragg, 2012; Nie et al., 2016). Bu nedenle, büyük ve kayda değer bir kaynak olan bitkisel bileşiklerin antitümör hedefli yeni terapötik ajanlar olarak etkinliklerinin ortaya konması büyük bir öneme sahiptir. Bir polihidroksifenolik bileşik olan gallik asit (GA), önemli biyoaktif bileşiklerden biridir (Chen et al., 2009). Ceviz, sumak, meşe kabuğu, yeşil çay, elma kabukları, üzüm, çilek, ananas, muz, limon gibi çeşitli bitki ve meyvelerde yaygın olarak bulunur (Sun et al., 2002; Wolfe et al., 2003; Chen et al., 2009). GA'nın anti-kanser (Yang et al., 2006) ve antioksidan (García-Ruiz et al., 1997) dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik aktiviteleri bildirilmiştir.

Bu çalışmada gallik asit, olaparib ve olaparib + gallik asit tedavilerinin parental U2OS insan osteosarkom hücre hattı ve olaparib direnci kazandırılmış U2OS insan osteosarkom hücreleri (U2OS-PIR) üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için WST-1 hücre canlılığı analizi yöntemi kullanıldı. Gallik asit tedavisinin özellikle yüksek konsantrasyonlarda (200 μ M ve üstü) parental U2OS hücreleri üzerinde kuvvetli bir

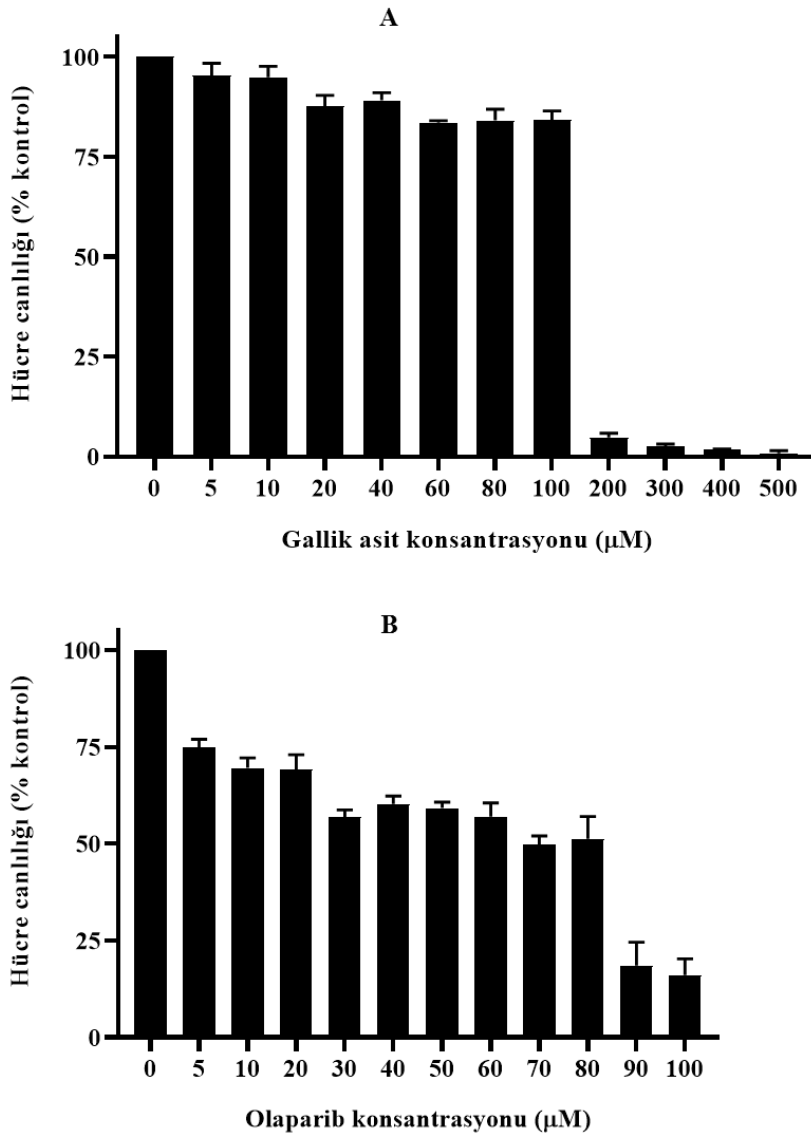
sitotoksik etkiye sahip olduğu görüldü (Şekil 4.1.A). Olaparibin ise en düşük konsantrasyonlarda (0,5 μM) bile parental U2OS hücrelerinde etkili bir antiproliferatif aktivite gösterdiği ve bu etkinin konsantrasyon bağımlı olduğu belirlendi (Şekil 4.1.B).



Şekil 4.1. Gallik asit (A) ve olaparib (B) ile 72 saat tedavi edilen parental U2OS hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafikleri

Gallik asitin, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri NCI-H460 hücrelerinde hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptoz ile hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir (Ji et al., 2009). Yine aynı çalışmada, bizim bulgularımızla uyumlu olarak, gallik asitin özellikle 200 μM ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

Olaparibe karşı direnç kazandırılmış U2OS hücrelerinde (U2OS-PIR) yine gallik asitin konsantrasyon bağımlı olarak yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.2.A). Dirençli hücrelerde parental hücrelere göre daha yüksek dozlarda (0-100 μM) uygulanan olaparib tedavisinin ise dirence bağı olarak hücrelerin canlılığını yüksek konsantrasyonlarda azalttığı belirlendi (Şekil 4.2.B).



Şekil 4.2. Gallik asit (A) ve olaparib (B) ile 72 saat tedavi edilen olaparib dirençli U2OS (U2OS-PIR) hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafikleri

U2OS ve U2OS-PIR hücrelerinde GA ile OL arasındaki sinerjizmin belirlenmesi için kombinasyon indeksleri (KI) hesaplandı. 72 saatlik tedavi sonucunda elde edilen hücre canlılığı değerlerinden hesaplanan IC50 değerlerinin yaklaşık yarısına (IC25) sahip konsantrasyonlar (GA için U2OS parental hücrelerde 66 μ M ve U2OS-PIR hücrelerinde 67 μ M, OL için U2OS parental hücrelerde 1,5 μ M ve U2OS-PIR hücrelerinde 37 μ M) kullanıldı (Tablo 4.1). U2OS hücreleri 66 μ M GA tedavisi sabit kalacak şekilde artan OL konsantrasyonlarıyla (0-10 μ M) ve ayrıca 1,5 μ M OL tedavisi sabit kalacak şekilde kombine artan GA konsantrasyonlarıyla (0-500 μ M) 72 saat süreyle tedavi edildi. U2OS-PIR hücreleri ise 67 μ M GA tedavisi sabit kalacak şekilde artan OL konsantrasyonlarıyla (0-100 μ M) ve ayrıca 37 μ M OL tedavisi sabit kalacak şekilde kombine artan GA konsantrasyonlarıyla (0-500 μ M) 72 saat süreyle tedavi edildi. U2OS parental hücreler için sadece 66 μ M gallik asit ve U2OS-PIR hücreleri için sadece 67 μ M gallik asit ile; U2OS parental hücreler için sadece 1,5 μ M olaparib ve U2OS-PIR hücreleri için sadece 37 μ M olaparib ile tedavi edilen hücrelerin canlılığı için okunan absorbans değerleri %100 canlılık olarak normalize edildi ve hesaplamalar yapıldı. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi U2OS parental ve U2OS-PIR hücrelerinde kombine tedavide GA için IC50 değerleri sırasıyla 54,6 \pm 3,54 μ M ve 61,64 \pm 2,13 μ M olarak hesaplanırken, OL için bu değerler sırasıyla 1,47 \pm 0,15 μ M ve 37,73 \pm 1,48 μ M olarak belirlendi.

Tablo 4.1. Mono- ve kombine- tedaviler sonucunda belirlenen IC50 dozları ve kombinasyon indeksleri

	Gallik asit / Olaparib	Olaparib-IC25 + Gallik asit	Gallik asit-IC25 + Olaparib
Gallik asit IC50 (μM)	131,89 \pm 13,79*	54,6 \pm 3,54*	
	133,99 \pm 1,71**	61,64 \pm 2,13**	
Olaparib IC50 (μM)	3,05 \pm 0,40*		1,47 \pm 0,15*
	73,39 \pm 3,76**		37,73 \pm 1,48**
Kombinasyon indeksi (KI)		0,89*	
		0,97**	

*Parental U2OS hücrelerinde

**Olaparib dirençli U2OS hücrelerinde (U2OS-PIR)

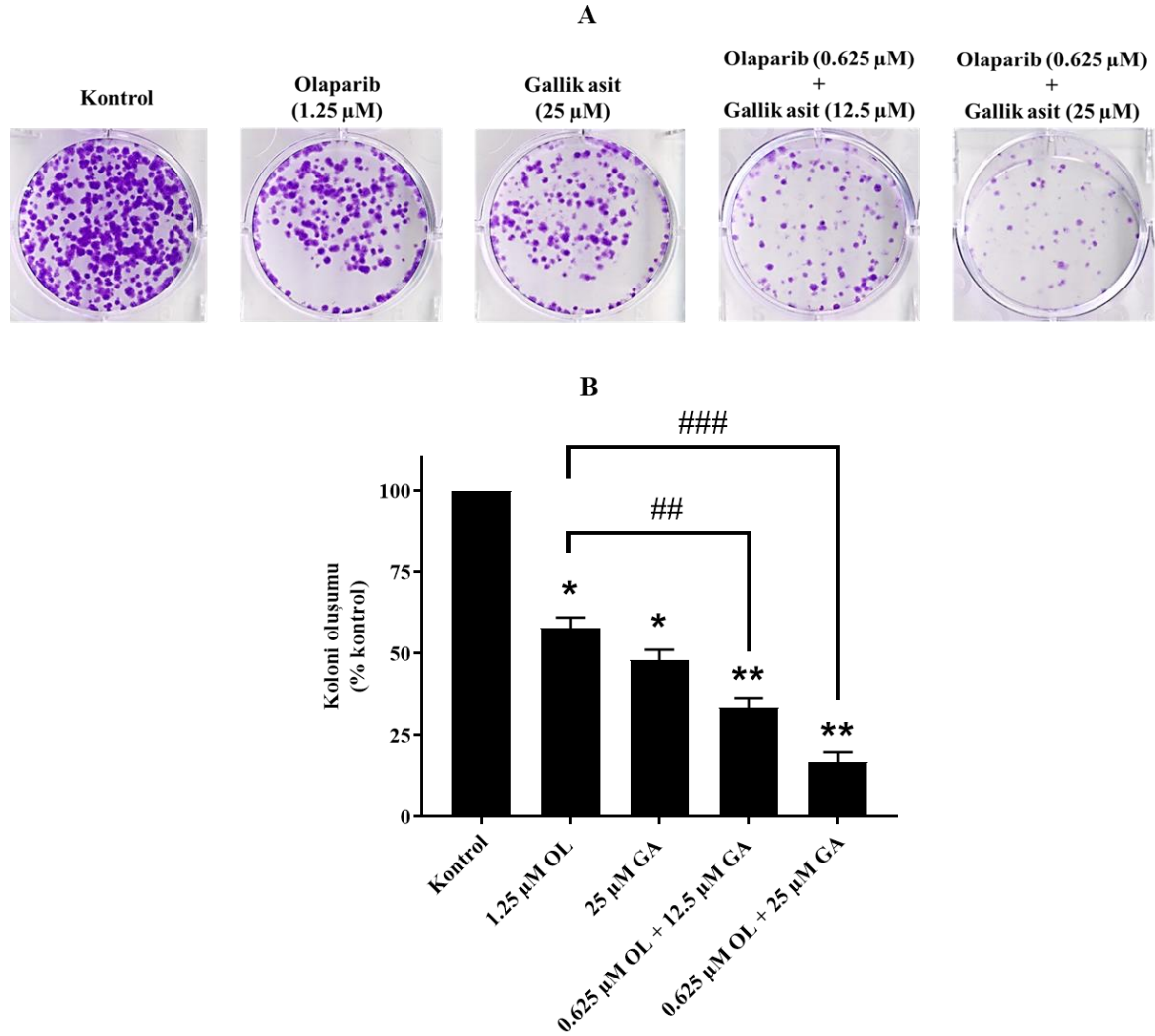
Kombine bir tedavide sinerjizmden bahsetmek için; terapötik etkinliğin artması, daha düşük dozlarda aynı etkinliği devam ettirmek veya arttırmak, ilaç direncinin önüne geçmek ya da minimize etmek, ve hedeflenen molekül veya mekanizmaya karşı seçici sinerjizm sağlamak gibi etkilerin bir veya birkaçının görülmesi gereklidir. Bu sinerjistik etkiler, ilaç kombinasyonlarının yoğun şekilde kullanılmasını ve kanser gibi pek çok tehlikeli hastalığa karşı tedavi etkinliğinin artmasını sağlamaktadır (Chou, 2006). GA ve kurkumin kombinasyonunun sinerjistik olarak MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladığı bir çalışmayla bildirilmiştir (Moghtaderi et al., 2018). Bizim çalışmamızda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, OL + GA kombinasyonunun kombinasyon indeksi (KI), U2OS ve U2OS-PIR hücrelerinde sırasıyla 0,89 ve 0,97 olarak belirlendi. Bu değerler $KI < 1$ olduğundan GA ile OL arasında sinerjizmin olduğunu ve gallik asitin sadece bitkisel bileşiklerle değil aynı zamanda kemoterapotiklerle de sinerjistik ilişki sergilediğini göstermektedir.

4.2. Koloni Sağ Kalımı Bulguları

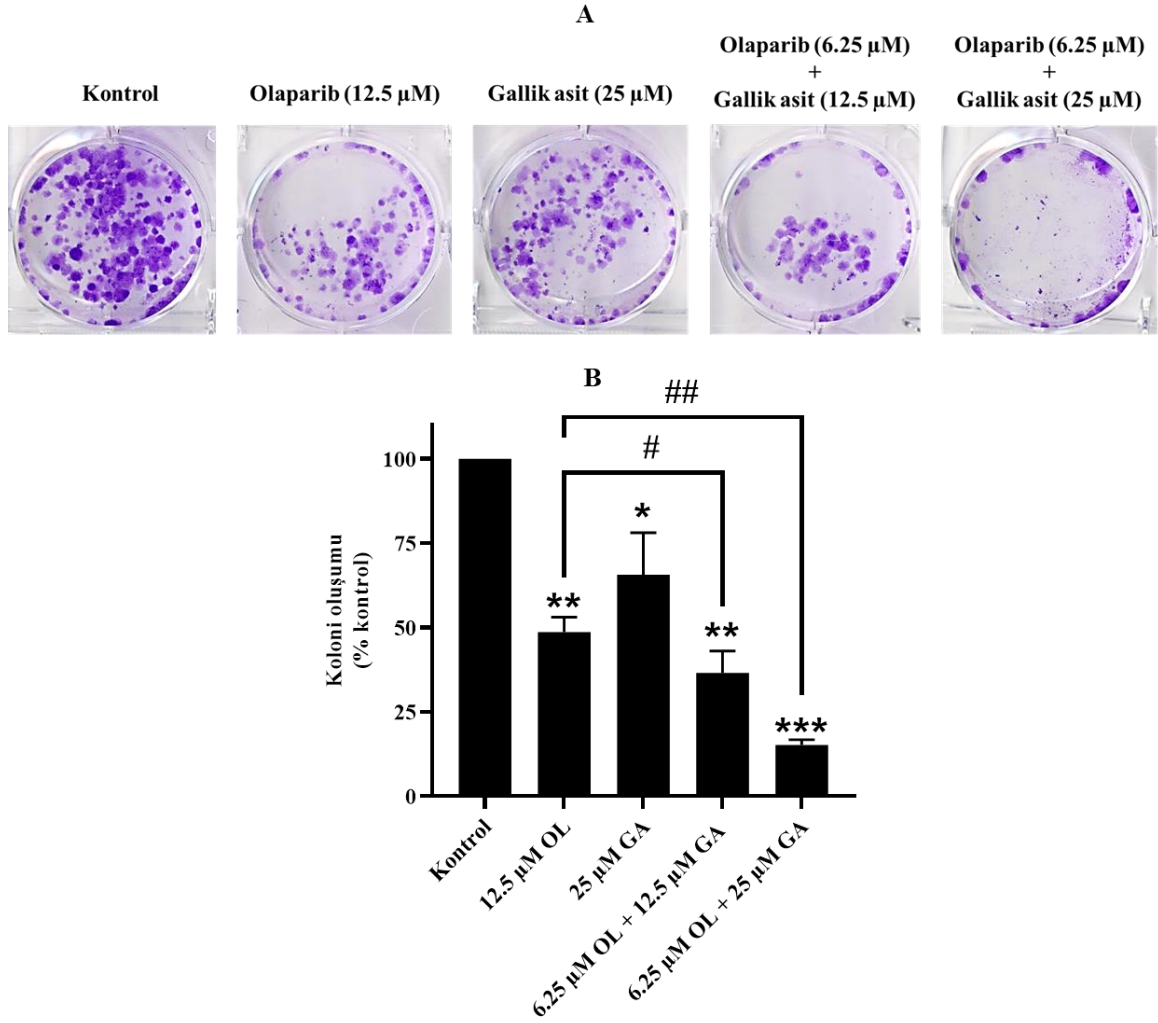
Koloni sağ kalımı analizi, sitotoksik ajanların etkinliğini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Franken et al., 2006). GA ve OL' nin bireysel ve kombine tedavilerinin U2OS ve U2OS-PIR hücreleri üzerindeki koloni oluşturma kapasitelerini etkileme potansiyelleri koloni sağ kalımı analizi ile değerlendirildi. Şekil 4.3-A'de görüldüğü gibi, U2OS parental hücrelerin koloni oluşumlarında tedavi edilmeyen hücrelere göre GA ve OL tedavileri ile anlamlı oranda azalma olduğu ($p < 0,05$), kombine tedavilerin ise koloni oluşumunu büyük ölçüde baskıladığı görüldü ($p < 0,01$). Sadece OL tedavisi uygulanan hücrelere göre OL + GA tedavisinin U2OS hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerini önemli oranda azalttığı belirlendi ($p < 0,01$ ve $p < 0,001$) (Şekil 4.3-B).

Şekil 4.4-A ve Şekil 4.4-B' de gösterildiği gibi, U2OS-PIR hücrelerinin koloni sağ kalımı üzerinde OL ve GA'in kullanılan konsantrasyonlarda bireysel olarak inhibe edici etkiye sahip olduğu, bu etkinin kombine tedavi ile birlikte daha da arttığı gözlemlendi ($p < 0,01$ ve $p < 0,001$). Ayrıca kombine tedavilerin, olaparibin tek başına kullanımına göre U2OS-PIR hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini önemli ölçüde baskıladığı belirlendi ($p < 0,05$ ve $p < 0,01$).

Koloni sağ kalımı analizlerinden elde edilen sonuçlar, gallik asitin olaparibin etkisini arttırdığı ve hem parental hem de olaparibe karşı direnç kazanmış hücrelerde de olaparib ile sinerjistik etkiye sahip olduğu hücre canlılığı bulgularını desteklemektedir.



Şekil 4.3. GA, OL ve OL + GA ile tedavi edilen U2OS hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri. ((A) U2OS hücreleri 60 mm kültür kaplarına ekilip bir gece inkübe edildikten sonra 72 saat boyunca yalnızca DMEM (kontrol), 1,25 μ M OL, 25 μ M GA, 0,625 μ M OL + 12,5 μ M GA ve 0,625 μ M OL + 25 μ M GA ile tedavi edildi. Bu sürenin sonunda tedaviler sonlandırıldı ve ilaçlı mediumlar uzaklaştırılarak tüm gruplar taze mediumda 10 gün bekletildi. Ardından materyal-metod kısmında belirtildiği şekilde boyama işlemi gerçekleştirildi ve oluşan kolonilerin görüntülenmesi sağlandı. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, ## $p < 0,01$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında, ### $p < 0,001$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında.)

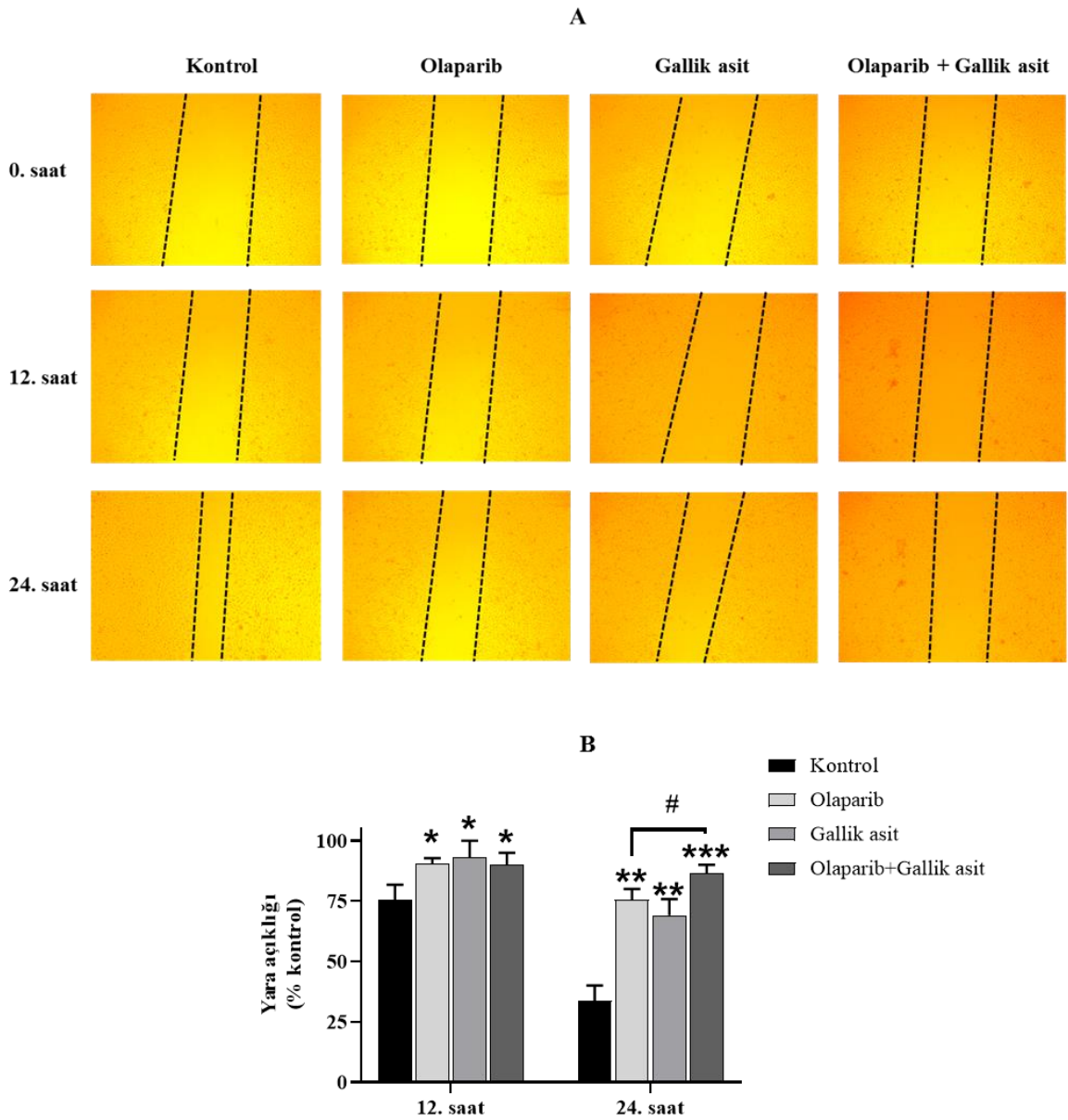


Şekil 4.4. GA, OL ve OL + GA ile tedavi edilen U2OS-PIR hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri. ((A) U2OS-PIR hücreleri 60 mm kültür kaplarına ekilip bir gece inkübe edildikten sonra 72 saat boyunca yalnızca DMEM (kontrol), 12,5 μ M OL, 25 μ M GA, 6,25 μ M OL + 12,5 μ M GA ve 6,25 μ M OL + 25 μ M GA ile tedavi edildi. Bu sürenin sonunda tedaviler sonlandırıldı ve ilaçlı mediumlar uzaklaştırılarak tüm gruplar taze mediumda 10 gün bekletildi. Ardından Materyal-metod kısmında belirtildiği şekilde boyama işlemi gerçekleştirildi ve oluşan kolonilerin görüntülenmesi sağlandı. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında, # $p < 0,05$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında, ## $p < 0,01$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında.)

4.3. Yara İyileşmesi Bulguları

Yara iyileşmesi analizi (wound-healing assay), *in vitro* hücre göçünü incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu analiz hücrelerin kültür kaplarında oluşturduğu tabakada bir "yara" oluşturmayı, yarayı kapatmak için hücre göçü sırasında başlangıçta ve düzenli aralıklarla görüntüleri yakalamayı ve hücrelerin göç oranını ölçmek için görüntüleri karşılaştırmayı içerir (Rodriguez et al., 2005). GA , OL ve OL + GA kombinasyonu ile

24 saat tedavi edilen U2OS-PIR hücrelerinin göç hızının belirlenmesi için yara iyileşmesi analizi gerçekleştirildi. Her grup kendi arasında 0. saat değerleri kullanılarak normalize edildi. Şekil 4.5-A'da görüldüğü gibi, 12. saat sonundaki yara kapanmasının bireysel ve kombine tedavi uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yavaşladığı ($p<0,05$), ancak sadece OL tedavisi ile kombine tedavi grubu arasında anlamlı bir farkın olmadığı görüldü ($p>0,05$, ns).



Şekil 4.5. U2OS-PIR hücreleri ile gerçekleştirilen yara iyileşmesi analizi sonuçları. ((A) 0., 12. ve 24. saat sonunda çizik alanının görüntüleri mikroskop altında incelenerek fotoğraflandı. (B) Normalizasyon yapılan yara açıklığı yüzdesi grafiği. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında, # $p<0,05$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında.)

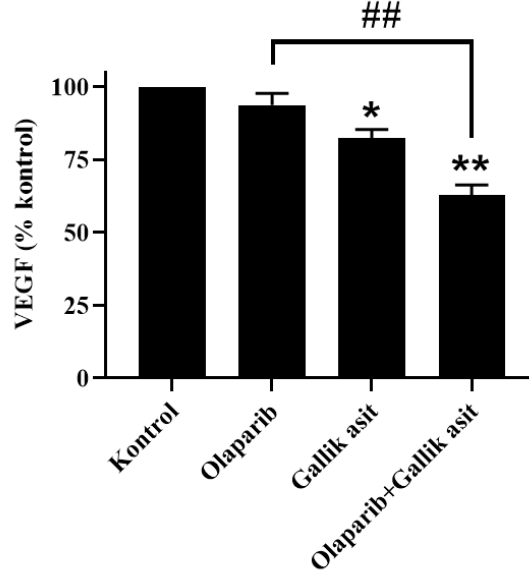
24. saatin sonunda ise yara açıklığının tedavi edilmeyen hücelere göre OL ve GA tedavisiyle daha geniş olduğu ($p<0,01$), bu genişliğin kombine tedavi uygulanan grupta çok daha anlamlı ölçüde fazla olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Aynı zamanda 24. saat sonunda kombine tedavinin bireysel OL tedavisine göre hücre migrasyonunu istatistiki olarak önemli ölçüde azalttığı görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.5-B). Bu bulgular, GA + OL kombinasyon tedavisinin U2OS-PIR hücre göçünü engellediğini gösteren daha yavaş bir çizik yarası iyileşme sürecine neden olduğunu göstermektedir.

4.4. Anjiyogenez Bulguları

Kanser hücreleri, metastaz olarak bilinen bir süreçle komşu organlara yayılma yeteneğine sahiptir. Kanser hücrelerinin bu yeteneği sayesinde yaşamı tehdit eden bir durum gelişir. Metastaz sürecinde damar ağının büyümesi çok önemli bir rol oynar (Parveen et al., 2019). Yeni kan damarları ve lenf damarları, sırasıyla anjiyogenez ve lenfanjiyogenez olarak bilinen mekanizmalarla oluşturulur. Tümör büyümesi, tümör hücreleri tarafından üretilen çeşitli sinyaller tarafından tetiklenen bu mekanizmalara bağlıdır (Ribatti et al., 2013; Trachana et al., 2016). Tümör hücreleri, anjiyogenez sürecinde kimyasal uyarımı başlatan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), nöropilinler ve integrinler gibi çeşitli anjiyojenik proteinler ve büyüme faktörleri içerir. VEGF, normal ve anormal anjiyogenezin anahtar düzenleyicisi olarak görev yapar. Bir sinyal proteini olan VEGF, vasküler geçirgenlik faktörü olarak bilinir. Endotelial hücreye özgü bir mitojen olarak tanımlanır. VEGF ailesi, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF ve plasental büyüme faktörleri (PlGF'ler) olmak üzere yedi üye içerir. VEGF ailesinin tüm üyeleri, ortak bir VEGF homoloji alanı içerir. VEGF ligandları, kanser gelişiminde rol oynayan farklı tirozin kinazlara ve tirozin olmayan kinaz reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler (Hoeben et al., 2004; Nishida et al., 2006). VEGF inhibisyonu yoluyla bu faktörleri baskılayarak veya inhibe ederek, potansiyel bir antikanser tedavisi geliştirilebilir (Parveen et al., 2019).

Bu çalışma kapsamında, olaparib dirençli kanser hücrelerinde (U2OS-PIR) uygulanan bireysel ve kombine tedavilere bağlı olarak değişen VEGF miktarları da *in vitro* olarak belirlenmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, sadece OL ile tedavi edilen hücrelerde VEGF miktarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmezken ($p>0,05$, ns), GA

($p<0,05$) ve OL + GA ($p<0,01$) tedavisi sonucunda kontrol grubuna göre VEGF miktarında anlamlı bir azalma görülmüştür.



Şekil 4.6. Olaparib, gallik asit ve olaparib + gallik asit kombinasyon tedavileri sonucunda U2OS-PIR hücrelerindeki VEGF miktarlarını gösteren grafik. (* $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, ## $p<0,01$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında.)

Vasküler ağ vücuttaki tüm hücrelere oksijen ve besin sağlar. Oksijenin katı tümör büyümesinin düzenlenmesinde en önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Anormal büyüme ve ardından oksijen arzı ve talebindeki dengesizlik nedeniyle katı tümörler, daha fazla oksijen elde etmek için yeni kılcal damarların büyümesini destekleyen hipoksiye neden olur (Zhao ve Hu, 2013). Önceki çalışmalar, gallik asidin *in vitro* ve *in vivo* anjiyogenezin azalmasından sorumlu olduğunu bildirmiştir (Liu et al., 2006). Bir insan plasental ven anjiyogenez modelinin kullanılmasıyla, gallik asidin, anjiyogenezin başlamasını ve yeni damar büyümesini önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (Liu et al., 2006). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, olaparibin Panc02 insan pankreas kanseri hücrelerinde doz bağımlı olarak anjiyogenezin indüklenmesini önlediğini göstermiştir (Quiñonero et al., 2022). Kanser hücrelerinin VEGF gibi anjiyojenik faktörleri salma kapasitesinin PARP1 inhibisyonu ile ilişkili olduğu önceki bir çalışmada gösterilmiştir (Martin-Oliva et al., 2006). Bizim bulgularımız ise, olaparib direnci kazandırılmış hücrelerde (U2OS-PIR) anjiyogenezin önemli bir belirteci olan VEGF miktarının OL

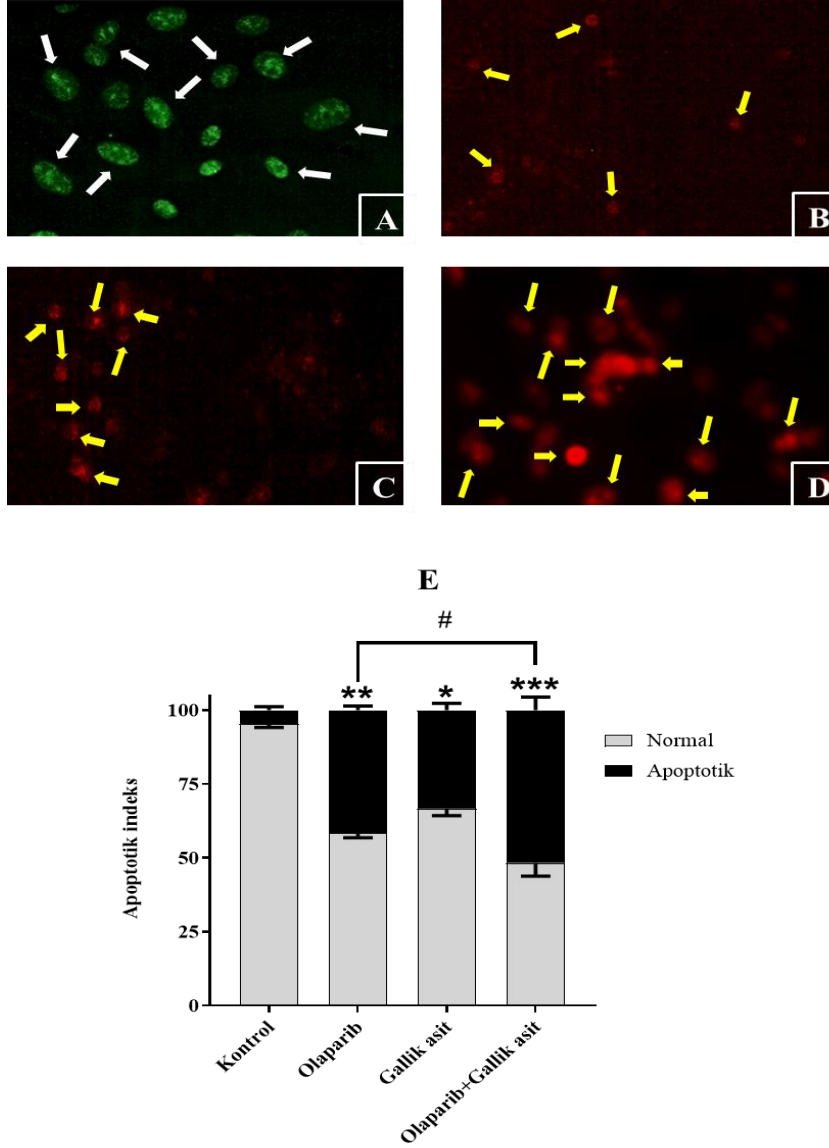
tedavisinde kontrole göre anlamlı şekilde azalmadığını ortaya koymuştur. Aynı zamanda kombine tedavinin, hem kontrol grubuna hem de OL tedavisine göre VEGF miktarını önemli ölçüde düşürdüğü ($p<0,01$) ve bu şekilde anti-anjiyogenik etki gösterdiği söylenebilir.

4.5. Apoptotik İndeks Bulguları

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, organizma gelişimi ve doku homeostazında önemli rol oynayan bir süreçtir. Bununla birlikte, kanser gibi patolojik koşullarda düzensiz apoptotik sinyalleme, özellikle bir anti-apoptotik sistemlerin aktivasyonu, kanser hücrelerinin bu programdan kaçmasına izin vererek, kontrolsüz çoğalmaya yol açarak tümörün hayatta kalması, terapötik direnç ve kanserin tekrarlanması ile sonuçlanır. Bu direnç, çeşitli moleküllerin ve sinyal yollarının etkileşimlerinden kaynaklanan karmaşık bir olgudur (Mohammad et al., 2015).

Apoptoz mekanizmaları sırasında hücre küçülmesi, nükleer kromatinin yoğunlaşması, DNA parçalanması ve apoptotik cisim oluşumu gibi önemli morfolojik değişiklikler görülür. Ardından membranlardan salınan fosfatidilserin, inflamatuvar yanıt olmaksızın hücrelerin fagositoz ile makrofajlarca ölürülmesine neden olur (Jeong et al., 2022). Anti-kanser tedavilerinin çoğu, malign hücreleri ortadan kaldırmak için apoptoz indüksiyonunu ve ilgili hücre ölümü ağlarını tetikler (Mohammad et al., 2015). U2OS-PIR hücrelerinde GA, OL ve OL + GA tedavilerinin neden olduğu apoptozun morfolojik olarak belirlenmesi için Akridin oranj/Etidyum bromür (AO/EB) ikili boyama yöntemi kullanıldı. Akridin oranj (AO) hem canlı hem de ölü hücrelere nüfuz ederken, bu hücrelerin DNA'sına bağlandığından canlı hücreler yeşil renkte görülür. Etidyum bromür (EB) sadece hücre zarları hasar görmüş hücreler tarafından içeri alınır. Apoptotik hücreler, membran bütünlüğü kaybının derecesine ve etidyum bromür ile birlikte boyamaya bağlı olarak turuncu veya kırmızı renkte boyanır. 72 saatlik tedavinin ardından hücreler akridin oranj ve etidyum bromür içeren karışım ile boyanarak floresan mikroskop altında canlı ve apoptotik hücre oranları belirlendi. Şekil 4.7' de gösterildiği gibi, GA ($p<0,05$), OL ($p<0,01$) ve OL + GA ($p<0,001$) tedavisi uygulanan gruplardaki apoptotik morfoloji gösteren hücre sayısı kontrol grubuna göre önemli ölçüde artarken,

aynı zamanda kombine tedavi uygulanan hücrelerdeki apoptotik indekste sadece OL ile tedavi edilen hücrelerdekine göre istatistiki olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,05$).



Şekil 4.7. Kontrol (A), OL (B), GA (C) ve OL + GA (D) ile tedavi edilen; U2OS-PIR hücrelerinin morfolojik görünümü. Beyaz oklar canlı hücreleri, sarı oklar ise apoptotik hücreleri göstermektedir. (E) AO/EB boyaması sonrasında hücrelerdeki morfolojik farklılıklara göre oluşturulan apoptotik indeks grafiği. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında, # $p < 0,05$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında.)

Gallik asit maruziyetinin, HeLa insan servikal kanser hücreleri, K562 insan lösemi hücreleri ve SMMCC-7721 insan hepatosellüler karsinom hücre hattında apoptotik hücre oranını arttırdığı rapor edilmiştir (You et al., 2010; Reddy et al., 2012; Sun et al., 2016). Liang ve arkadaşları GA'in U2OS ve MNNG/HOS insan osteosarkoma hücrelerinin

apoptozunu indüklediğini ve hücrelerde erken apoptotik morfolojik özellikler tespit edildiğini göstermişlerdir (Liang et al., 2012). Yapılan bazı çalışmalar GA'nın apoptoz yoluyla kanser hücresi ölümünü seçici olarak indüklediğini ve normal hücrelere karşı hiçbir sitotoksiste göstermediğini bildirilmiştir (Inoue et al., 1994; Inoue et al., 1995; Isuzugawa et al., 2001). Ayrıca, GA, kanser kemoprevensiyonu için yararlı bir fitokimyasal olarak kabul edilir (Surh, 2003). Bizim bulgularımız da, tüm bu çalışmalarla uyumlu olarak, GA ile tedavi edilen U2OS-PIR hücrelerinin de apoptoza yöneldiğini ve bu yönelimin kombine tedavide daha yüksek oranda olduğunu ortaya koymaktadır.

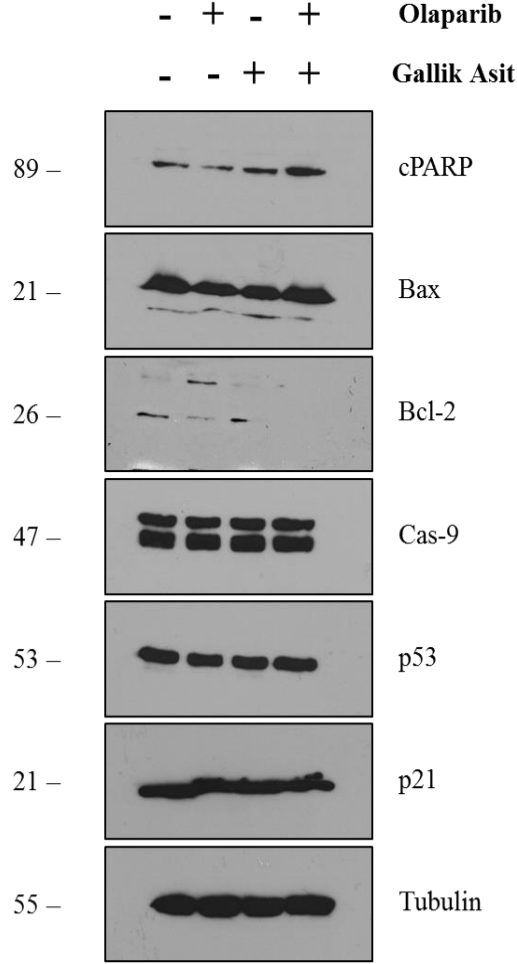
4.6. Western Blot Bulguları

Poli (ADP-ribosil)asyon, hücre enerji seviyesinden etkilenen DNA hasarına bağlı bir süreçtir. Poli (ADP-riboz) (PAR) seviyesi, poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve PAR'ın katabolizmasından sorumlu ana enzim olan poli (ADP-riboz) glikohidrolazın karşıt hareketleri tarafından kontrol edilir (Mahfouz et al., 2009). Poli (ADP-riboz) metabolizması, çok çeşitli biyolojik süreçlerde kritik öneme sahiptir. Bunlar arasında DNA onarımı ve genomik stabilitenin korunması, transkripsiyonel düzenleme, sentromer ve sentrozomal fonksiyon, mitotik iğ oluşumu, telomer dinamikleri, apoptoz ve nekroz yer alır (Amé et al., 2004; Bürkle, 2005; Wacker et al., 2007; Hassa and Hottiger, 2008).

İnsanlarda PARP-1 en çok ifade edilen üyedir (Amé et al., 2004). Poli (ADP-riboz) polimeraz 1, poli (ADP-ribosil)asyon sürecinde birincil bir rol oynar ve genom onarımı, karsinogenez, yaşlanma, bağışıklık, inflamatuvar durumlar ve nörolojik fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir (Kim et al., 2005; Wacker et al., 2007; Mahfouz et al., 2009). PARP-1'in bir formu olan cPARP'ın ortaya çıkması, apoptotik hücre ölümünün son aşamasını simgeleyen genomik bütünlüğün kaybını gösterir (Sittihan et al., 2022). Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da görüldüğü gibi cPARP proteininin ekspresyonundaki artışın GA ($p<0,05$) ve OL + GA ($p<0,001$) tedavisi uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı olduğu, ayrıca, kombine tedavinin sadece olaparib tedavisine göre de cPARP miktarını önemli ölçüde arttırdığı görüldü ($p<0,001$).

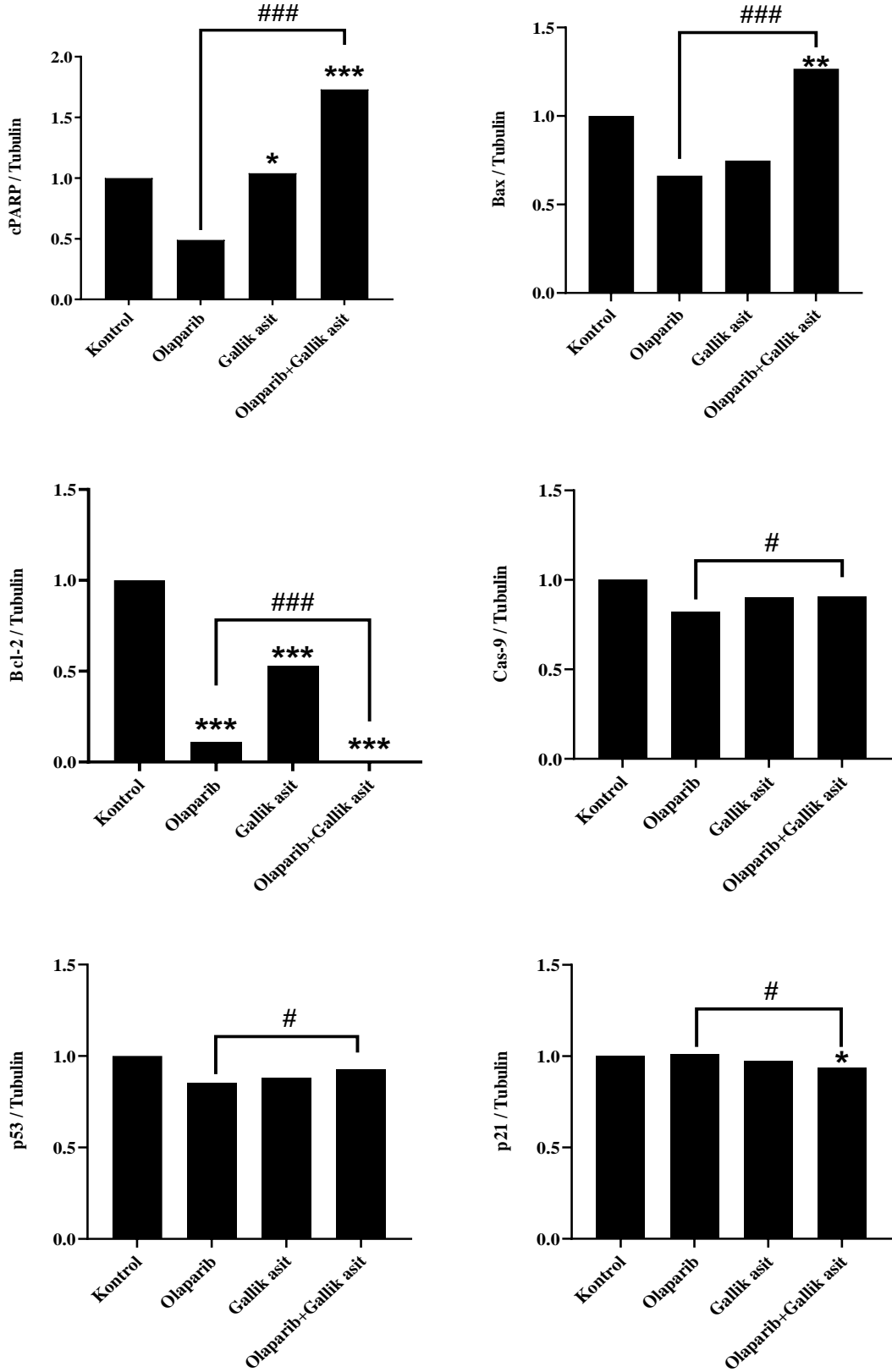
Olaparib ve gallik asit tedavisi Bax seviyesini kontrol grubuna göre arttırmazken, olaparib + gallik asit kombinasyon tedavisinin Bax miktarında anlamlı bir artışa neden

olduğu görüldü ($p<0,01$). Yine kombine tedavi uygulanan hücrelerdeki Bax protein düzeyindeki artış sadece olaparib tedavisi uygulanan hücrelere göre de önemli bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Olaparib, gallik asit ve olaparib + gallik asit kombinasyon tedavileri sonucunda U2OS-PIR hücrelerindeki cPARP, Bax, Bcl-2, Cas-9, p53 ve p21 proteinlerinin ifade düzeylerini gösteren bant görüntüleri. U2OS-PIR hücreleri sitotoksosite analizleri ile belirlenen IC50 dozları ve IC50 dozlarının yarısı ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Sonuçlar tubulin ile normalize edildi

GA, OL ve OL+GA tedavilerinin Bcl-2 protein ekspresyonunu herhangi bir tedavi uygulanmayan hücrelere göre anlamlı oranda azalttığı ($p<0,001$), aynı zamanda kombine tedavinin sadece olaparib tedavisine göre de Bcl-2 seviyesini önemli oranda inhibe ettiği gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.9. GA, OL ve OL + GA ile tedavi edilen U2OS-PIR hücrelerinde cPARP, Bax, Bcl-2, Cas-9, p53 ve p21 proteinlerinin ifade düzeyleri. (* $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında, # $p < 0,05$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında, ### $p < 0,001$; sadece OL tedavisi uygulanan grup ile kıyaslandığında.)

Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da görüldüğü gibi GA, OL ve OL+GA tedavilerinin kaspaz-9 ve p53 ekspresyonlarını kontrol grubuna göre arttırmadığı, ancak sadece olaparib uygulanan hücrelere göre ise kombine tedavinin her iki proteinin ekspresyonunda az bir artışa sebep olduğu görüldü ($p<0,05$).

p21 protein seviyesinin sadece kombine tedavi uygulanan hücrelerde tedavi edilmeyen hücrelere göre bir miktar azaldığı ($p<0,05$), yine kombine tedavinin sadece olaparib tedavisine göre de p21 protein ekspresyonunda azalmaya neden olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

Polifenoller, klasik antikanser ilaçlarının toksisitelerini azaltabilen, standart antikanser tedavilerinin ilaç direncinin üstesinden gelmeye yardımcı olan ve potansiyel kanser kemoterapötik ajanlarının doğal kaynaklarıdır (Bayet-Robert et al., 2010). Bir polifenolik asit türü olan gallik asit, yüksek biyoaktiviteye sahip olması ve toksik olmaması nedeniyle ilgi çekici bir bileşiktir (Shahrzad et al., 2001). Gallik asitin, TE-2 özofagus kanseri, MDA-MB-231 meme kanseri, CaSki serviks kanseri MKN-28 mide kanseri ile HT-29 ve Colo201 kolon kanseri gibi çeşitli insan kanser hücre hatlarında potansiyel bir antikanser ajanı olduğu ortaya koyulmuştur (Faried et al., 2007).

Önceki çalışmalar gallik asitin oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve hücre içi Ca^{2+} seviyesindeki artış ile bağlantılı olarak kanser hücrelerinin apoptozunu indüklediğini göstermiştir (Serrano et al., 1998; Inoue et al., 2000). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, gallik asitin tek başına ve paklitaksel veya karboplatin ile kombinasyon halinde destekleyici tedavi olarak potansiyeli araştırılmıştır (Aborehab et al., 2021). Söz konusu çalışmada, gallik asitin özellikle paklitaksel ve karboplatin ile kombine kullanımının MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılığını inhibe ettiği, Bax ve p53 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini up-regüle ederken, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 protein ve mRNA seviyesini ise down-regüle ettiği rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada, 5-florourasil veya okzalipatin ile kombine GA tedavisinin HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde, Bax ve Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyinde kontrole göre önemli oranda arttığı, Bcl-2 mRNA ifade düzeyinde ise kontrole göre azalma meydana geldiği gösterilmiştir (Özer, 2021). AGS insan mide kanseri hücrelerinde GA maruziyetine bağlı olarak apoptotik hücre ölümünün indüklendiği ve hücrelerde Kaspaz-3, -8 ve -9 protein

düzeylerinde artış, Bcl-2 protein seviyesinde ise düşüş meydana geldiği gözlemlenmiştir (Tsai et al., 2018). Yine GA tedavisinin A375.S2 insan malign melanoma hücrelerini apoptoza yönlendirdiği ve sitokrom c, Bax, Kaspaz-3 ve -9 proteinlerinin seviyesinde artışa neden olurken Bcl-2 protein seviyesinde ise azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (Lo et al., 2010). Bizim çalışmamızda ise GA + OL kombinasyonunun olaparib tedavisine göre U2OS-PIR hücrelerinin canlılığını önemli oranda baskıladığı, cPARP ve Bax gibi apoptozla ilişkili proteinleri up-regüle ederken, anti-apoptotik Bcl-2 protein düzeyini down-regüle ettiği gösterildi. Bu bulgular, GA ve OL arasındaki sinerjistik ilişkinin apoptozun tetiklenmesi sonucunda ortaya çıktığını düşündürmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kazanılmış ilaç direnci, kanser tedavisinin başarısız olmasına neden olan önemli bir problem haline gelmiştir. Bu çalışmada, küçük molekül PARP inhibitörü olarak klinik öncesi ve klinik araştırmalarda başarılı sonuçlar sağlayan olaparib ile bir bitkisel etken madde olan gallik asidin, *in vitro* kanser modeli olarak seçilen olaparibe karşı direnç kazandırılmış U2OS insan osteosarkoma hücrelerinde, hücre çoğalması ve apoptoz üzerine olan sinerjistik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmalar kapsamında yapılan analizler sonucunda elde edilen bulgular ışığında, uygulanan tedavilerin moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması; olaparibe karşı dirençli kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve antiproliferatif etkinlikleri ile daha az yan etkiye sahip yeni kombine tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Sonuç olarak, olaparib ile gallik asidin kombine tedavisi olaparib dirençli U2OS hücrelerinin canlılığını, koloni oluşturma kapasitelerini, migrasyon yeteneklerini ve anjiyogenezini önemli seviyede inhibe etmiştir. Ayrıca hücrelerin uygulanan kombine tedavi ile birlikte anlamlı derecede apoptotik morfoloji gösterdiği, apoptoz ve DNA hasarı için önemli belirteçler olan bazı proteinlerin (cPARP, Bax, Bcl-2) ifadelerinin de regüle edildiği görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen bulgular, kazanılmış ilaç direncine karşı gallik asidin göz önünde bulundurulması gereken bir ajan olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulguların ileri dönemlerde yapılacak *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi, kanser tedavisinde büyük bir engel teşkil eden ve tedavi başarısını önemli ölçüde düşüren kazanılmış ilaç direncine karşı yeni yaklaşımların önünün açılmasına katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

Aborehab, N. M., Elnagar, M. R. and Waly, N. E. (2021). Gallic acid potentiates the apoptotic effect of paclitaxel and carboplatin via overexpression of Bax and P53 on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(2), e22638.

Ahmad, R., Ahmad, N., Naqvi, A. A., Shehzad, A. and Al-Ghamdi, M. S. (2017). Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(2), 195-204.

Amé, J. C., Spenlehauer, C. and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *BioEssays*, 26(8), 882-893.

Assaraf, Y. G., Brozovic, A., Gonçalves, A. C., Jurkovicova, D., Linē, A., Machuqueiro, M., ... and Vasconcelos, M. H. (2019). The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*, 46, 100645.

Bayet-Robert, M., Kwiatowski, F., Leheurteur, M., Gachon, F., Planchat, E., Abrial, C., ... and Chollet, P. (2010). Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer biology & therapy*, 9(1), 8-14.

Bell, C., Lynam, E., Landfair, D. J., Janjic, N. and Wiles, M. E. (1999). Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 35(9), 533-542.

Benjamin, L. E. and Keshet, E. (1997). Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8761-8766.

Bochum, S., Berger, S. and Martens, U. M. (2018). Olaparib. *Small Molecules in Oncology*, 217-233.

Bonanno, L., Favaretto, A. and Rosell, R. (2014). Platinum drugs and DNA repair mechanisms in lung cancer. *Anticancer research*, 34(1), 493-501.

Bürkle, A. (2005). Poly(ADP-ribose). *The FEBS Journal*, 272(18), 4576-4589.

Carneiro, B. A. and El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.

Chen, H. M., Wu, Y. C., Chia, Y. C., Chang, F. R., Hsu, H. K., Hsieh, Y. C., ... and Yuan, S. S. (2009). Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer letters*, 286(2), 161-171.

Chen, Y., Zhu, Z., Chen, J., Zheng, Y., Limsila, B., Lu, M., ... and Liao, W. (2021). Terpenoids from *Curcumae Rhizoma*: Their anticancer effects and clinical uses on combination and versus drug therapies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *138*, 111350.

Chia, Y. C., Rajbanshi, R., Calhoun, C. and Chiu, R. H. (2010). Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. *Molecules*, *15*(11), 8377-8389.

Chou, T. C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 621.

Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J., ... and Feder, J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, *84*(5), 1470-1478.

Dallavalle, S., Dobričić, V., Lazzarato, L., Gazzano, E., Machuqueiro, M., Pajeva, I., ... and Fruttero, R. (2020). Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors. *Drug Resistance Updates*, *50*, 100682.

D'amours, D., Desnoyers, S., D'silva, I. and Poirier, G. G. (1999). Poly (ADP-ribosyl) ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*, *342*(2), 249-268.

Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, *116*(2), 205-219.

Denijn, M. and Ruiter, D. J. (1993). The possible role of angiogenesis in the metastatic potential of human melanoma. Clinicopathological aspects. *Melanoma Res*, *3*(1), 5-14.

Dilmaç, S. (2014). *Metastatik ve nom metastatik tümörlerde nefronektin ekspresyonu* (Yüksek lisans, Akdeniz Üniversitesi).

Doğrul, B. N., Kiliccalan, I. and Aşçı, E. S. (2016). The protective effect of gallic acid against endocrine disrupting damages of Bisphenol A and possible mechanism. *Journal of Contemporary Medical Education*, *4*(1), 1-13.

Drean, A., Lord, C. J. and Ashworth, A. (2016). PARP inhibitor combination therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*, *108*, 73-85.

Edwards, S. L., Brough, R., Lord, C. J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D. A., ... and Ashworth, A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*, *451*(7182), 1111-1115.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, *35*(4), 495-516.

Erdoğan, M. K. (2016). *HT-29 kolon kanseri hücre hattında bazı bitki ekstreleri ve bitkisel etken maddelerin 5-fluorouracil (5-FU) ile kombinasyonunun apoptotik yollara ve hücre çoğalmasına etkilerinin araştırılması* (Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi).

- Erdogan, M. K., Halil Gecibesler, I., Yapar, Y., Gundogdu, R., Kirici, M., Behcet, L. and Taslimi, P. (2021). Fatty acid composition, enzyme inhibitory effect, antioxidant and anticancer activity of extract from *Saponaria prostrata* WILLD. subsp. *anatolica* HEDGE. *Bioorganic Chemistry*, 113, 105032.
- Fan, X. L., Cai, G. P., Zhu, L. L. and Ding, G. M. (2015). Efficacy and safety of ifosfamide-based chemotherapy for osteosarcoma: a meta-analysis. *Drug design, development and therapy*, 9, 5925–5932.
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L. S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H. and Kuwano, H. (2007). Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *International journal of oncology*, 30(3), 605-613.
- Farmer, S. (2005). Regulation of PPAR γ activity during adipogenesis. *International journal of obesity*, 29(1), S13-S16.
- Feinberg, R. A., Kadam, R., Hokama, L. and Kim, I. (2002). The state of electronic customer relationship management in retailing. *International Journal of Retail & Distribution Management*, 30(10), 470-481.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england journal of medicine*, 285(21), 1182-1186.
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315-2319.
- Fulda, S. (2009). Tumor resistance to apoptosis. *International journal of cancer*, 124(3), 511-515.
- García-Ruiz, C., Colell, A., Marí, M., Morales, A. and Fernández-Checa, J. C. (1997). Direct Effect of Ceramide on the Mitochondrial Electron Transport Chain Leads to Generation of Reactive Oxygen Species: ROLE OF MITOCHONDRIAL GLUTATHIONE*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11369-11377.
- Gichner, T., Pospíšil, F., Velemínský, J., Volkeová, V. and Volke, J. (1987). Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the ames/Salmonella assay. *Folia microbiologica*, 32(1), 55-62.
- Goodarzi, A. A. and Jeggo, P. A. (2013). The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Advances in genetics*, 82, 1-45.
- Green, D. R. and Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer cell*, 1(1), 19-30.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. and Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature reviews Drug discovery*, 14(2), 111-129.

Hassa, P. O. and Hottiger, M. O. (2008). The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *FBL*, 13(8), 3046-3082.

Heller, R., Jaroszeski, M. J., Glass, L. F., Messina, J. L., Rapaport, D. P., De Conti, R. C., ... and Reintgen, D. S. (1996). Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 77(5), 964-971.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T. and De Bruijn, E. A. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews*, 56(4), 549.

Hogendoorn, P., Athanasou, N., Bielack, S., De Alava, E., Dei Tos, A., Ferrari, S., ... and Hassan, B. (2010). Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, 21, 204-213.

Holmgren, L., O'reilly, M. S. and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature medicine*, 1(2), 149-153.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N. and Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792.

https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid (erişim tarihi: 11.09.2022).

<https://en.wikipedia.org/wiki/Olaparib> (erişim tarihi: 11.09.2022).

<https://evrimagaci.org/programli-huce-olumu-apoptosis-apoptoz-nedir-canlilar-neden-hucelelerini-bilerek-oldururler-257> (erişim tarihi: 12.09.2022).

<https://www.drozdogan.com/lynparza-olaparib-nedir-hangi-kanserlerin-tedavisinde-kullanilir/> (erişim tarihi: 28.09.2022).

Huang, W. Y., Cai, Y. Z. and Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62(1), 1-20.

Hunter, K. W., Crawford, N. P. and Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res*, 10(1), 1-10.

Imani, A., Maleki, N., Bohlouli, S., Kouhsoltani, M., Sharifi, S. and Maleki D. S. (2021). Molecular mechanisms of anticancer effect of rutin. *Phytotherapy Research*, 35(5), 2500-2513.

Inoue, M., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Tani, H. and Ogihara, Y. (2000). Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23(10), 1153-1157.

- Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T., Sakaguchi, N., Ogihara, Y. and Yabu, Y. (1994). Antioxidant, Gallic Acid, Induces Apoptosis in HL-60RG Cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 204(2), 898-904.
- Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., ... and Chen, Y. (1995). Selective Induction of Cell Death in Cancer Cells by Gallic Acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 18(11), 1526-1530.
- Isuzugawa, K., Inoue, M. and Ogihara, Y. (2001). Catalase Contents in Cells Determine Sensitivity to the Apoptosis Inducer Gallic Acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(9), 1022-1026.
- Jeong, S. H., Kim, H. H., Ha, S. E., Park, M. Y., Bhosale, P. B., Abusaliya, A., ... and Kim, G. S. (2022). Flavones: Six Selected Flavones and Their Related Signaling Pathways That Induce Apoptosis in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10965.
- Ji, B. C., Hsu, W. H., Yang, J. S., Hsia, T. C., Lu, C. C., Chiang, J. H., ... and Chung, J. G. (2009). Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7596-7604.
- Kaku, K., Inoue, Y. and Kaneko, T. (1995). Extrapancratic effects of sulfonylurea drugs. *Diabetes research and clinical practice*, 28, 105-108.
- Kangas, M., Henry, J. L. and Bryant, R. A. (2005). The course of psychological disorders in the 1st year after cancer diagnosis. *Journal of consulting and clinical psychology*, 73(4), 763.
- Kelderman, S., Schumacher, T. N. and Haanen, J. B. (2014). Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Molecular oncology*, 8(6), 1132-1139.
- Kim, M. Y., Zhang, T. and Kraus, W. L. (2005). Poly (ADP-ribosyl) ation by PARP-1:PAR-laying NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes & development*, 19(17), 1951-1967.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87(1), 99-163.
- Kroes, B. V., Van den Berg, A., Van Ufford, H. Q., Van Dijk, H. and Labadie, R. (1992). Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta medica*, 58(6), 499-504.
- Lenz, H. J. (2003). Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. *Cancer treatment reviews*, 29, 41-48.
- Li, J., Wang, R., Kong, Y., Broman, M. M., Carlock, C., Chen, L., ... and Liu, X. (2017). Targeting Plk1 to Enhance Efficacy of Olaparib in Castration-Resistant Prostate Cancer Olaparib in CRPC Treatment. *Molecular cancer therapeutics*, 16(3), 469-479.
- Liang, C. Z., Zhang, X., Li, H., Tao, Y. Q., Tao, L. J., Yang, Z. R., ... and Tao, H. M. (2012). Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27(10), 701-710.

Lippert, T. H., Ruoff, H. J. and Volm, M. (2008). Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. *Arzneimittelforschung*, 58(06), 261-264.

Liu, B., Earl, H. M., Baban, D., Shoaibi, M., Fabra, A., Kerr, D. J. and Seymour, L. W. (1995). Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF. *Biochemical and biophysical research communications*, 217(3), 721-727.

Liu, Z., Schwimer, J., Liu, D., Lewis, J., Greenway, F. L., York, D. A. and Woltering, E. A. (2006). Gallic acid is partially responsible for the antiangiogenic activities of Rubus leaf extract. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(9), 806-813.

Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S. W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L. L., ... and Green, D. R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular cell*, 44(4), 517-531.

Lo, C., Lai, T. Y., Yang, J. H., Yang, J. S., Ma, Y. S., Weng, S. W., ... and Chung, J. G. (2010). Gallic acid induces apoptosis in A375. S2 human melanoma cells through caspase-dependent and-independent pathways. *International Journal of Oncology*, 37(2), 377-385.

Lord, C. J. and Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), 110-120.

Mahfouz, R. Z., Sharma, R. K., Poenicke, K., Jha, R., Paasch, U., Grunewald, S. and Agarwal, A. (2009). Evaluation of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis. *Fertility and Sterility*, 91(5), 2210-2220.

Maleki, P. D., Sadoughi, F., Asemi, Z. and Yousefi, B. (2022). The role of polyphenols in overcoming cancer drug resistance: a comprehensive review. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), 1.

Martin-Oliva, D., Aguilar-Quesada, R., O'valle, F., Munoz-Gómez, J. A., Martínez-Romero, R., García del Moral, R., ... and Oliver, F. J. (2006). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer research*, 66(11), 5744-5756.

McDonald, N. Q. and Hendrickson, W. A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, 73(3), 421-424.

McGee, S. F., Lanigan, F., Gilligan, E. and Groner, B. (2006). Mammary gland biology and breast cancer. *EMBO reports*, 7(11), 1084-1088.

Moghtaderi, H., Sepehri, H., Delphi, L. and Attari, F. (2018). Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. *BioImpacts: BI*, 8(3), 185-194.

Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H. Y., Lin, L. T., ... and Azmi, A. S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35, 78-103.

- Mundy, G. R. and Yoneda, T. (1995). Facilitation and suppression of bone metastasis. *Clinical orthopaedics and related research*, 3(12), 34-44.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB journal*, 13(1), 9-22.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311-335.
- Nie, J., Zhao, C., Deng, L., Chen, J., Yu, B., Wu, X., ... and Chen, X. (2016). Efficacy of traditional Chinese medicine in treating cancer. *Biomed Rep*, 4(1), 3-14.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213.
- Norbury, C. J. and Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(1), 367-401.
- Özer, B. O. (2021). *Kolon kanseri tedavisi için yeni nanoterapötik modalitelerin geliştirilmesi*, (Doktora tezi, Trakya Üniversitesi).
- Parveen, A., Subedi, L., Kim, H. W., Khan, Z., Zahra, Z., Farooqi, M. Q. and Kim, S. Y. (2019). Phytochemicals Targeting VEGF and VEGF-Related Multifactors as Anticancer Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, 8(3), 350.
- Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N. and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Molecular cell*, 37(4), 492-502.
- Polewski, K., Kniat, S. and Slawinska, D. (2002). Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. *Curr Top Biophys*, 26(2), 217-227.
- Pötgens, A., Lubsen, N. H., Van Altena, M., Vermeulen, R., Bakker, A., Schoenmakers, J., ... and De Waal, R. (1994). Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32879-32885.
- Quiñonero, F., Mesas, C., Muñoz-Gámez, J. A., Jiménez-Luna, C., Perazzoli, G., Prados, J., ... and Ortiz, R. (2022). PARP1 inhibition by Olaparib reduces the lethality of pancreatic cancer cells and increases their sensitivity to Gemcitabine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, 113669.
- Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H. M. and Cortes, J. E. (2009). Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer control*, 16(2), 122-131.
- Reddy, T. C., Reddy, D. B., Aparna, A., Arunasree, K. M., Gupta, G., Achari, C., ... and Reddanna, P. (2012). Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-κB inactivation. *Toxicology in vitro*, 26(3), 396-405.

Ribatti, D., Nico, B., Ranieri, G., Specchia, G. and Vacca, A. (2013). The Role of Angiogenesis in Human Non-Hodgkin Lymphomas. *Neoplasia*, 15(3), 231-238.

Rodriguez, L. G., Wu, X. and Guan, J. L. (2005). *Wound-Healing Assay. Cell Migration: Developmental Methods and Protocols* (pp23-29) NJ, USA: Springer.

Saelens, X., Festjens, N., Walle, L. V., Gulp, M. V., Loo, G. V. and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16), 2861-2874.

Sayın, M. (2021). *Karragenanın İnsan Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi* (Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi).

Senapathy, J. G., Jayanthi, S., Viswanathan, P., Umadevi, P. and Nalini, N. (2011). Effect of gallic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in 1, 2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis in Wistar rats—a chemopreventive approach. *Food and chemical toxicology*, 49(4), 887-892.

Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespón, C., Villar, M. L., Nocito, M. and González-Porqué, P. (1998). Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 350(1), 49-54.

Shahrzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A. and Bitsch, I. (2001). Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 131(4), 1207-1210.

Shaikh, A. B., Li, F., Li, M., He, B., He, X., Chen, G., ... and Dang, L. (2016). Present advances and future perspectives of molecular targeted therapy for osteosarcoma. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 506.

Shewach, D. S. and Kuchta, R. D. (2009). Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chemical reviews*, 109(7), 2859-2861.

Siclari, V. A. and Qin, L. (2010). Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 5(1), 1-10.

Sittihan, S., Sopha, P. and Ruchirawat, S. (2022). Synthesis and Anticancer Activity of Pentafluorobenzenesulfonamide Derivatives as Caspase-Dependent Apoptosis-Inducing Agents. *ChemMedChem*, 17(3).

Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X. and Liu, R. H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449-7454.

Sun, G., Zhang, S., Xie, Y., Zhang, Z. and Zhao, W. (2016). Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Letters*, 11(1), 150-158.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768-780.

Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. and Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 5(3), 219-234.

Tomao, F., Papa, A., Rossi, L., Zaccarelli, E., Caruso, D., Zoratto, F., ... and Tomao, S. (2014). Angiogenesis and antiangiogenic agents in cervical cancer. *OncoTargets and Therapy*, 7, 2237–2248.

Trachana, S. P., Pilalis, E., Gavalas, N., Tzannis, K., Papadodima, O., Liontos, M., ... and Bamias, A. (2016). The Development of an Angiogenic Protein “Signature” in Ovarian Cancer Ascites as a Tool for Biologic and Prognostic Profiling. *PLOS ONE*, 11(6).

Tsai, C. L., Chiu, Y. M., Ho, T. Y., Hsieh, C. T., Shieh, D. C., Lee, Y. J., ... and Wu, Y. Y. (2018). Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Anticancer Research*, 38(4), 2057-2067.

Verma, S., Singh, A. and Mishra, A. (2013). Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental toxicology and pharmacology*, 35(3), 473-485.

Vermoortele, F., Vandichel, M., Van de Voorde, B., Ameloot, R., Waroquier, M., Van Speybroeck, V. and De Vos, D. E. (2012). Electronic effects of linker substitution on Lewis acid catalysis with metal–organic frameworks. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(20), 4887-4890.

Wacker, D. A., Ruhl, D. D., Balagamwala, E. H., Hope, K. M., Zhang, T. and Kraus, W. L. (2007). The DNA Binding and Catalytic Domains of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Cooperate in the Regulation of Chromatin Structure and Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21), 7475-7485.

Wang, C. Y., Lin, K. H., Yang, C. J., Tsai, J. R., Hung, J. Y., Wang, P. H., ... and Huang, M. S. (2010). Toona Sinensis Extracts Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in the Human Lung Large Cell Carcinoma. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 26(2), 68-75.

Wang, X., Zhang, H. and Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 2(141).

Wolfe, K., Wu, X. and Liu, R. H. (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 609-614.

World Health Organization (2016). *Book World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs sustainable development goals*.

Xavier, C. P., Lima, C. F., Preto, A., Seruca, R., Fernandes-Ferreira, M. and Pereira-Wilson, C. (2009). Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation

and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer letters*, 281(2), 162-170.

Yan, G. N., Lv, Y. F. and Guo, Q. N. (2016). Advances in osteosarcoma stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets. *Cancer letters*, 370(2), 268-274.

Yang, C., Xie, X., Tang, H., Dong, X., Zhang, X. and Huang, F. (2018). Transcriptome analysis reveals GA induced apoptosis in HCT116 human colon cancer cells through calcium and p53 signal pathways. *RSC Advances*, 8(22), 12449-12458.

Yeni, P. G., Hammer, S. M., Carpenter, C. C., Cooper, D. A., Fischl, M. A., Gatell, J. M., ... and Katzenstein, D. A. (2002). Antiretroviral treatment for adult HIV infection in 2002: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *Jama*, 288(2), 222-235.

You, B. R., Moon, H. J., Han, Y. H. and Park, W. H. (2010). Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1334-1340.

Zhang, T., Ma, L., Wu, P., Li, W., Li, T., Gu, R., ... and Xiao, Z. (2019). Gallic acid has anticancer activity and enhances the anticancer effects of cisplatin in non-small cell lung cancer A549 cells via the JAK/STAT3 signaling pathway. *Oncol Rep*, 41(3), 1779-1788.

Zhao, B. and Hu, M. (2013). Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Oncology letters*, 6(6), 1749-1755.