

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GALLİK ASİDİN DOSETAKSEL VE MİTOKSANTRON KEMOTERAPİ
İLAÇLARI İLE KOMBİNASYONLARININ İNSAN AKCİĞER KANSER
HÜCRE HATTI (A549) ÜZERİNDE *IN VİTRO* ANTİKANSER
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ, HÜCRE HATTI VE
KOMBİNASYONLARDA ANTİOKSİDAN VE ENZİM
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA

Burhan BUDAK

OCAK-2023
GÜMÜŞHANE



T.C.

**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**GALLİK ASİDİN DOSETAKSEL VE MİTOKSANTRON KEMOTERAPİ
İLAÇLARI İLE KOMBİNASYONLARININ İNSAN AKCİĞER KANSER
HÜCRE HATTI (A549) ÜZERİNDE *IN VİTRO* ANTİKANSER
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ, HÜCRE HATTI VE
KOMBİNASYONLARDA ANTİOKSİDAN VE ENZİM
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**DETERMINATION OF *IN VITRO* ANTICANCER ACTIVITY ON
HUMAN LUNG CANCER CELL LINE (A549) OF COMBINATION WITH
DOCETAXEL ON MITOXANTRONE CHEMOTHERAPY DRUGS OF
GALLIC ACID, INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ENZYME
ACTIVITIES IN CELL LINES AND COMBINATIONS**

DOKTORA

Burhan BUDAK

OCAK-2023

GÜMÜŞHANE



T.C.

**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**GALLİK ASİDİN DOSETAKSEL VE MİTOKSANTRON KEMOTERAPİ
İLAÇLARI İLE KOMBİNASYONLARININ İNSAN AKCİĞER KANSER
HÜCRE HATTI (A549) ÜZERİNDE *IN VİTRO* ANTİKANSER
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ, HÜCRE HATTI VE
KOMBİNASYONLARDA ANTİOKSİDAN VE ENZİM
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**DETERMINATION OF *IN VITRO* ANTICANCER ACTIVITY ON
HUMAN LUNG CANCER CELL LINE (A549) OF COMBINATION WITH
DOCETAXEL ON MITOXANTRONE CHEMOTHERAPY DRUGS OF
GALLIC ACID, INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ENZYME
ACTIVITIES IN CELL LINES AND COMBINATIONS**

DOKTORA

Burhan BUDAK

Danışman: Prof. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA

OCAK-2023

GÜMÜŞHANE

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Doktora Tezi olarak hazırlamış olduğum “**Gallik Asidin Dosetaksel ve Mitoksantron Kemoterapi İlaçları ile Kombinasyonlarının İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı (A549) Üzerinde *In Vitro* Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi, Hücre Hattı ve Kombinasyonlarda Antioksidan ve Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi**” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğu intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

13/01/2023

.....

Burhan BUDAK

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır. Lisansüstü eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü ve Biyoteknoloji Anabilim Dalına teşekkür ederim.

Maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, yol göstererek, sorumluluk vererek gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA'ya, çalışma arkadaşım Öğretim Görevlisi Cuma ZEHRİROĞLU'na, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında hücre kültürü çalışmaları için yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ahmet ALTAY'a, Esma Kübra KAĞAN YENİÇERİ'ye ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca doktora tez çalışmalarım sırasında bana her zaman anlayış gösteren ve destek olan eşim Esra BUDAK'a, lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan aileme eğitim hayatım boyunca bana verdikleri maddi ve manevi destekten dolayı teşekkür ederim.

Burhan BUDAK
GÜMÜŞHANE – 2023

ÖZET

Fenolik asitlerin antioksidan, antimutajenik ve antikanser gibi birçok olumlu etkisi bulunmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların fayda-zarar ilişkisi tartışılmakta ve bu nedenle yeni etken maddelerin arayışları devam etmektedir.

Çalışmamızda fenolik asit olan Gallik asidin Dosetaksel ve Mitoksantron gibi kemoterapötik ajanlarla kombinasyonları hazırlandı ve akciğer kanseri hücre hattı (A549) üzerinde *in vitro* antikanser aktivitesi incelenmiştir. En etkili konsantrasyonları belirlemek için CompuSyn programı kullanılmıştır. En etkin dozun uygulandığı hücre hattında antioksidan enzim aktiviteleri (CAT, SOD, GR ve GST) ve karbonik anhidraz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Hücre dışında yapılan çalışmalarda madde ve kombinasyonların antioksidan ve antiradikal aktiviteleri ve CAI, II ve IX enzimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Sonuç olarak Gallik asidin ve Mitoksantronun beraber kullanımında sinerjik etkinin gözlemlendiği, % 87.10 canlılık oranını 24 saat sonunda önemli derecede azaltarak (% 15.85) hücre apoptozunun sağlandığı ve antioksidan enzim aktivite sonuçlarının da destekleyici olduğu görülmüştür. Hücre dışında yapılan çalışmalarda ise kombinasyonların antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin ve CAI, II ve IX enzimleri üzerinde inhibisyon etkilerinin bulunduğu görülmüştür.

Sonuçlar değerlendirildiğinde Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun (25 μ M + 0.5 μ M) akciğer kanseri tedavisi için uygun olabileceği kanaatine varılmıştır. Dosetaksel ile hazırlanan kombinasyon çalışmalarında olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen sinerjik etki gözlemlenemediğinden tedaviye uygun olmadığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Enzim, Fenolik asit, Kanser, Kemoterapi

SUMMARY

Phenolic acids have many positive effects such as antioxidant, antimutagenic and anticancer. The benefit-harm relationship of the chemotherapeutic agents used for cancer treatment is discussed, and thus the search for new active agents continues.

In our study, combinations of Gallic acid, phenolic acid, with chemotherapeutic agents such as Docetaxel and Mitoxantrone were prepared and *in vitro* anticancer activity on lung cancer cell line (A549) was investigated. The CompuSyn program was used to determine concentrations. Antioxidant enzyme activities (CAT, SOD, GR and GST) and carbonic anhydrase enzyme activity were determined in the cell line where the most effective dose was applied. In extracellular studies, the antioxidant and antiradical activities of substances and combinations and their effects on CAI, II and IX enzymes were investigated.

Consequently, a synergistic effect was observed in the use of Gallic acid and Mitoxantrone, cell apoptosis was achieved by significantly reducing viability 87.10 % at the end of 24 hours (15.85 %) and antioxidant enzyme activity results were also supportive. In extracellular studies, it has been observed that the combinations have antioxidant and antiradical activities and inhibition effects on CAI, II and IX enzymes.

When the results were evaluated, it was concluded that the combination of Gallic acid and Mitoxantrone (25 μ M + 0.5 μ M) might be suitable for the treatment of lung cancer. Although positive results were obtained in combination studies prepared with Docetaxel, it was thought that it is not suitable for treatment because no synergistic effect was observed.

Keywords: Antioxidant, Enzyme, Phenolic acid, Cancer, Chemotherapy

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	III
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIX
1.GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller	1
1.2. Antioksidanlar	1
1.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	2
1.2.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	3
1.2.2.1. Fenolik Asitler.....	4
1.3. Karbonik Anhidraz Enzimi	5
1.4. Kanser	6
1.4.1. Akciğer Kanseri	7
1.4.2. Kanser Tedavisinde Kullanılan Kemoterapi İlaçları.....	8
1.4.2.1. Dosetaksel	9
1.4.2.2. Mitoksantron	10
1.4.3. Kemoterapi İlaçlarının Yan Etkileri.....	10
1.4.4. Önceki Çalışmalar.....	11
1.5. Çalışmanın Amacı.....	17
1.6. Çalışmanın Kapsamı	18
2. MATERYAL VE METOT	20
2.1. Kullanılan Kimyasallar	20
2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	20
2.3. Kullanılan Hücre Hatları	20
2.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	20
2.4.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	20

2.4.1.1. Fenolik Bileşiklerin, Kemoterapi İlaçlarının ve Bu Bileşiklerin Uygun Kombinasyonlarının Hazırlanması	20
2.4.1.2. DPPH · Giderme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler	21
2.4.1.3. ABTS• ⁺ Giderme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	21
2.4.1.4. DMPD• ⁺ Giderme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler	21
2.4.1.5. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ İndirgeme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler	21
2.4.1.6. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ (FRAP) İndirgeme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	22
2.4.1.7. Cu ²⁺ -Cu ⁺ İndirgeme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	22
2.4.2. Fenolik Maddelerin ve Kemoterapi İlaçlarının Hazırlanması.....	22
2.4.2.1. Gallik asit	22
2.4.2.2. Mitoksantron	22
2.4.2.3. Dosetaksel	22
2.4.2.4. Fenolik Madde ve Kemoterapi İlaç Kombinasyonun Hazırlanması	23
2.4.3. Hücre Proliferasyon Testi (XTT) İçin Çözelti Hazırlanması	23
2.4.4. Bisinkoninik Asit (BCA) Testi İçin Çözeltilerin Hazırlanması	23
2.4.5. Apoptoz Testinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	23
2.4.6. Antioksidan Enzim Aktivitesi Metodu İçin Çözeltilerin Hazırlanması	23
2.4.6.1. Katalaz (CAT) Enzimi	23
2.4.6.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi	24
2.4.6.3. Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzimi	24
2.4.6.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzimi	24
2.4.7. Karbonik Anhidraz (CA I, II ve IX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	24
2.5. Hücre Kültürü Uygulamaları	25
2.5.1. Hücre Hattı ve Kültürü.....	25
2.5.2. Hücrelerin Çözdürülmesi	25
2.5.3. Besiyeri Değişimi.....	25
2.5.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	25
2.5.5. Hücrelerin Sayımı	26
2.5.6. Hücrelerin Dondurulması.....	26
2.6. İnsan Akciğer Adenokarsinoma (A549) Kanser Hücre Hatları Üzerinde Fenolik ve Kemoterapik Ajanların Antikanser Etkinin İncelenmesi	27
2.6.1 Hücre Proliferasyonu Testi (XTT Testi)	27
2.6.2. CompuSyn Programı.....	27
2.6.3. BCA (Bisinkoninik Asit) Protein Tayini	28

2.6.4. Apoptoz Testi	28
2.6.5. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	28
2.6.5.1. Katalaz (CAT) Enzimi Aktivite Ölçüm	28
2.6.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Aktivite Ölçümü	29
2.6.5.3. Glutasyon S-transferaz (GST) Enzimi Aktivite Ölçümü.....	29
2.6.5.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzimi Aktivite Ölçümü	29
2.6.6. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	30
2.7. Antioksidan Aktivitesi Tayin Metodları	30
2.7.1. DPPH · Giderme Metodu	30
2.7.2. ABTS• ⁺ Giderme Metodu	31
2.7.3. DMPD• ⁺ Giderme Metodu.....	31
2.7.4. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ İndirgeme Metodu.....	31
2.7.5. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ (FRAP) İndirgeme Metodu	32
2.7.6. Cu ²⁺ -Cu ⁺ İndirgeme Kapasitesi.....	32
2.7.7. In Vitro Antioksidan Çalışmalarında Etkin Kombinasyon Değerinin Belirlenmesi.....	32
2.8. Karbonik Anhidraz (hCAI, hCAII ve hCAIX) Aktivitesi.....	32
3. BULGULAR.....	33
3.1. İnsan Akciğer Adenokarsinoma (A549) Kansere Hücre Hatları Üzerinde Fenolik ve Kemoterapik Ajanların Antikanser Etkisi	33
3.1.1. Hücre Proliferasyonu Testi (XTT Testi) Değerlendirilmesi	33
3.1.2. CompuSyn Değerlendirilmesi.....	39
3.1.3. BCA (Bisinkoninik asit) Protein Tayini Bulguları	40
3.1.4. Apoptoz Testinin Değerlendirilmesi	41
3.1.5. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	41
3.1.5.1. Katalaz (CAT) Enzimi Aktivite Ölçüm Bulguları	41
3.1.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Aktivite Ölçüm Bulguları	43
3.1.5.3. Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzimi Aktivite Ölçüm Bulguları	45
3.1.5.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzimi Aktivite Ölçüm Bulguları.....	46
3.1.6. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	49
3.2. Antioksidan Aktivite Bulguları	50
3.2.1. DPPH · Giderme Metodu Bulguları	50
3.2.2. ABTS ⁺ Giderme Metodu Bulguları	51
3.2.3. DMPD ⁺ Giderme Metodu Bulguları	53
3.2.4. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ İndirgenme Kapasitesi Metodu Bulguları	54

3.2.5. Fe^{3+} - Fe^{2+} Kapasitesi (FRAP) Metodu Bulguları	55
3.2.6. Cu^{2+} - Cu^{1+} İndirgenme (Kuprak) Metodu Bulguları	57
3.2.7. <i>In Vitro</i> Antioksidan Aktivite Bulgularının Sinerjik Etkilerinin Belirlenmesi	58
3.2.7.1. DPPH· Giderme Metodu Bulguları	59
3.2.7.2. ABTS ^{·+} Giderme Metodu Bulguları	60
3.2.7.3. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgenme Metodu Bulguları	61
3.2.7.4. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgenme (FRAP) Metodu Bulguları	62
3.2.7.5. Cu^{2+} - Cu^{1+} İndirgenme (Kuprak) Metodu Bulguları	64
3.3. Karbonik Anhidraz (hCAI, II ve IX) Aktivitesi Bulguları	65
3.3.1. Karbonik Anhidraz hCAI Aktivitesi Bulguları	65
3.3.2. Karbonik Anhidraz hCAII Aktivitesi Bulguları	67
3.3.2. Karbonik Anhidraz hCAIX aktivitesi bulguları	69
4. TARTIŞMA	72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
KAYNAKÇA	82
ÖZGEÇMİŞ	95

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asidin % inhibisyon değerleri	34
Tablo 2. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Mitoksantronun % inhibisyon değerleri	35
Tablo 3. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Dosetakselin % inhibisyon değerleri	36
Tablo 4. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonlarının % inhibisyon değerleri	37
Tablo 5. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonlarının % inhibisyon değerleri	39
Tablo 6. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonlarının XTT metoduna göre bulunan ve Compusyn programına girilen doz ve absorbans değerleri	39
Tablo 7. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonlarının XTT metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz ve absorbans değerleri.....	39
Tablo 8. Farklı konsantrasyonlardaki standart BSA absorbans değerleri	40
Tablo 9. Protein Konsantrasyonları.....	40
Tablo 10. A549 kanser hücresi ve Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM) apoptotik değerleri	41
Tablo 11. Farklı konsantrasyonlardaki formaldehit stardardına karşılık ölçülen absorbans sonuçları	42
Tablo 12. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu hesaplanan CAT aktivitesi (nmol/dk/mL) sonuçları	43
Tablo 13. Farklı konsantrasyonlardaki SOD enzim konsantrasyonuna karşılık ölçülen absorbans değerleri	44
Tablo 14. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu hesaplanan SOD aktivitesi (U/mL) sonuçları.....	44

Tablo 15. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu hesaplanan Δ_{A340} ve GST aktivitesi (nmol/dk/mL) sonuçları.....	46
Tablo 16. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu hesaplanan i-eğim değerleri ve GSH konsantrasyonu (μ M) sonuçları.....	48
Tablo 17. Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için DPPH $\cdot$ giderme aktivitesi IC ₅₀ değerleri.....	51
Tablo 18. Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için ABTS $^{++}$ giderme aktivitesi IC ₅₀ değerleri.....	52
Tablo 19. Gallik asit ve kombinasyonları için DMPD $^{++}$ giderme aktivitesi IC ₅₀ değerleri.....	54
Tablo 20. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ indirgeme kapasitesi metoduna göre; Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için 5 μ g/mL’de ölçülen absorbens değerleri	55
Tablo 21. Frap Fe ³⁺ -Fe ²⁺ indirgeme kapasitesi metoduna göre; Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için 5 μ g/mL’de ölçülen absorbens değerleri.....	57
Tablo 22. Cu ²⁺ -Cu ¹⁺ indirgeme kapasitesi metoduna göre; Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için 5 μ g/mL’de ölçülen absorbens değerleri	58
Tablo 23. Gallik asit ve Dosetakselin DPPH $\cdot$ giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	59
Tablo 24. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun DPPH $\cdot$ giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri	59
Tablo 25. Gallik asit ve Dosetakselin ABTS $^{++}$ giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	60
Tablo 26. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun ABTS $^{++}$ giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri	60
Tablo 27. Gallik asit ve Mitoksantron’un ABTS $\cdot^+$ giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	60
Tablo 28. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun ABTS $\cdot^+$ giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri	61

Tablo 29. Gallik asit ve Dosetakselin Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	61
Tablo 30. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri	61
Tablo 31. Gallik asit ve Mitoksantron' un Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	62
Tablo 32. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri	62
Tablo 33. Gallik asit ve Dosetakselin Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme (FRAP) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	63
Tablo 34. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme (FRAP) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri	63
Tablo 35. Gallik asit ve Mitoksantron' un Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	63
Tablo 36. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri	63
Tablo 37. Gallik asit ve Dosetakselin Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	64
Tablo 38. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri	64
Tablo 39. Gallik asit ve Mitoksantron' un Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri.....	64
Tablo 40. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri.....	65
Tablo 41. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μM), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μM) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μM) maddelerinin hCAI enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAI enzim aktivite (EU/mL) ve standart sapma değerleri	66

Tablo 42. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAI enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla hesaplanan inhibisyon değerleri (%)	67
Tablo 43. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCA II enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCA II enzim aktivite (EU/mL) ve standart sapma değerleri	68
Tablo 44. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAII enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla hesaplanan inhibisyon değerleri (%)	69
Tablo 45. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCA IX enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCA II enzim aktivite (EU/mL) ve standart sapma değerleri	70
Tablo 46. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAIX enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla hesaplanan inhibisyon değerleri (%)	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Antioksidan sınıflandırılması.....	2
Şekil 2. Gallik asidin açık formu.....	5
Şekil 3. Antrasiklinlerin sınıflandırılması	8
Şekil 4. Antrasiklin grubu kemoterapi ilaçlarının molekül formülleri (Pashaei vd., 2020).	8
Şekil 5. A549 hücre hatlarının faz kontrast mikroskopunda sırasıyla farklı büyütmelelerdeki (10x, 20x ve 40x) görüntüleri	33
Şekil 6. Gallik asidin 25µM-150µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskopunda 10x büyütmedeki görüntüleri	33
Şekil 7. A549 hücre hatlarının faz kontrast mikroskopunda sırasıyla farklı büyütmelelerdeki (10x, 20x ve 40x) görüntüleri	34
Şekil 8. Mitoksantronun 0.1µM-10µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskopunda 10x büyütmedeki görüntüleri	34
Şekil 9. A549 hücre hattının faz kontrast mikroskopunda 10x büyütmedeki görüntüsü	35
Şekil 10. Dosetakselin 5µM-50µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskopunda 10x büyütmedeki görüntüleri	36
Şekil 11. Gallik asit 25 µM ve Dosetaksel 5µM-50µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskopunda 10x büyütmedeki görüntüleri	37
Şekil 12. Gallik asit 25µM ve Mitoksantron 0.1µM-5µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskopunda 10x büyütmedeki görüntüleri	38
Şekil 13. Gallik asit 50µM ve Mitoksantron 0.1µM-5µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskopunda 10x büyütmedeki görüntüleri	38
Şekil 14. BCA protein tayini için kullanılan sıgır serum albümin standart grafiği.....	40
Şekil 15. Gallik asit ve Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM) kombinasyonunun A549 hücre hattındaki apoptoz sonuçları	41
Şekil 16. Katalaz (CAT) enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için kullanılan formaldehit standart grafiği	42
Şekil 17. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen CAT aktivitesi (nmol/dk/mL) sütun grafiği.....	43
Şekil 18. Süperoksit dismutaz (SOD) standart grafik	44

Şekil 19. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen SOD aktivitesi (U/mL) sütun grafiği	45
Şekil 20. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen GST aktivitesi (nmol/dk/mL) sütun grafiği.....	46
Şekil 21. Farklı konsantrasyonlarda (0-16 μ M) GSH standardı kullanılarak çizilen absorbans zaman grafiği	47
Şekil 22. GR aktivitesini belirlemek amacıyla kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen absorbans zaman grafiği	47
Şekil 23. GR enzim aktivitesini belirlemek amacıyla çizilen i-eğim GSH grafiği	48
Şekil 24. GR aktivitesini belirlemek amacıyla kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen GSH konsantrasyonu (μ M) sütun grafiği.....	49
Şekil 25. Akciğer kanser (A549) hücrelerine Gallik asit ve Mitoksantron ilaç kombinasyonu (25 μ M + 0.5 μ M) uygulaması sonucu 24 saat sonunda alınan protein örneği için hesaplanan spesifik aktivite grafiği (%)	49
Şekil 26. Gallik asit ve Mitoksantron maddelerinin (1-11 μ g/mL) DPPH $\cdot$ giderme aktivitesi grafiği	50
Şekil 27. Kombinasyonların (Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetaksel) (2-22 μ g/mL) DPPH $\cdot$ giderme aktivitesi grafiği.....	50
Şekil 28. Gallik asit ve Mitoksantron maddelerinin (1-6 μ g/mL) ABTS $^{+\cdot}$ giderme aktivitesi grafiği	51
Şekil 29. Kombinasyonların (Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetaksel) (1.125-6.750 μ g/mL) ABTS $^{+\cdot}$ giderme aktivitesi grafiği.....	52
Şekil 30. Gallik asidin farklı konsantrasyonlardaki (1-11 μ g/mL) DMPD $^{+\cdot}$ giderme aktivitesi grafiği	53
Şekil 31. Kombinasyonların (Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetaksel) (1.125-6.750 μ g/mL) DMPD $^{+\cdot}$ giderme aktivitesi grafiği	53
Şekil 32. Gallik asit, Mitoksantron ve Dosetaksel maddelerinin farklı konsantrasyonlardaki (1-17 μ g/mL) Fe $^{3+}$ - Fe $^{2+}$ indirgeme kapasitesi grafiği...	54
Şekil 33. Kombinasyonların (Gallik asit + Dosetaksel ve Gallik asit + Mitoksantron) (2-34 μ g/mL) Fe $^{3+}$ -Fe $^{2+}$ indirgeme kapasitesi grafiği.....	55

Şekil 34. Gallik asit, Mitoksantron ve Dosetaksel maddelerinin (1-17 µg/mL) Frap metoduna göre Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi grafiği	56
Şekil 35. Kombinasyonların (Gallik asit + Dosetaksel ve Gallik asit + Mitoksantron) (2-34 µg/mL) Frap metoduna göre Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi grafiği.....	56
Şekil 36. Gallik asit, Mitoksantron ve Dosetaksel maddelerinin (1-17 µg/mL) Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme kapasitesi grafiği	57
Şekil 37. Kombinasyonların (Gallik asit + Dosetaksel ve Gallik asit + Mitoksantron) (2-34 µg/mL) Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme kapasitesi grafiği.....	58
Şekil 38. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 µM), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 µM) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 µM) maddelerinin hCA I enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAI enzim aktivite (EU/mL) grafiği.....	66
Şekil 39. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 µM), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 µM) ve Gallik asit ve Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 µM) maddelerinin hCA I enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla çizilen inhibisyon (%) grafiği	67
Şekil 40. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 µM), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 µM) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 µM) maddelerinin hCA II enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAII enzim aktivite (EU/mL) grafiği	68
Şekil 41. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 µM), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 µM) ve Gallik asit ve Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 µM) maddelerinin hCA II enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla çizilen inhibisyon (%) grafiği.....	69
Şekil 42. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 µM), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 µM) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 µM) maddelerinin hCA IX enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAIX enzim aktivite (EU/mL) grafiği.....	70
Şekil 43. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 µM), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 µM) ve Gallik asit ve Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 µM) maddelerinin hCA IX enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla çizilen inhibisyon (%) grafiği.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADC	: Adenokarsinom
ANT	: Antrasiklinler
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Butillenmiş hidroksitoluen
BSA	: Bovin serum albumin
CA	: Karbonik anhidraz
CAT	: Katalaz
CI	: Kombinasyon indeks
DNR	: Daunorubisin
DOC	: Dosetaksel
DOX	: Doksorubisin
EPI	: Epirubisin
GA	: Gallik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon s-transferaz
IDA	: İdarubisin
MIX	: Mitoksantron
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
PG	: Propil gallat
PSA	: Prostat spesifik antijen
PTX	: Paklitaksel
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SCC	: Skuamöz hücreli karsinom
SOD	: Süperoksit dismutaz
VAL	: Valrubisin

1.GİRİŞ

1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, eşlenmemiş değerlik elektronları içeren atomlar, moleküller yada iyonların türleridir. Eşlenmemiş elektronlar; serbest radikallerin elektronları diğer bileşiklerden alarak yada vererek onlara yüksek reaktivite kazandırmasına olanak sağlarlar. Oldukça reaktif karakterlerinden dolayı, serbest radikaller genellikle geçicidir ve çevrelerindeki moleküllere seçici olmayan bir şekilde reaksiyona girerler. Çoğu durumda “serbest radikaller” terimi genellikle “reaktif oksijen türleri (ROS)” ile karıştırılabilir. Ancak farklı tanımlara sahiptirler. Serbest radikaller, oksijenle ilgili ve oksijenle alakasız olmak üzere eşlenmemiş değerlik elektronları içeren atomlar, moleküller veya iyonlardır. Reaktif oksijen türleri ise, oksijen atomları içeren kimyasal reaktif türlerdir. Oksijenle ilişkili radikaller dışında, radikal olmayan tekli oksijen ($^1\text{O}_2$) gibi türlerde vardır (Wang vd., 2021). ROS kendi içerisinde iki gruba ayrılır. Birinci grupta hidroksil ($\text{OH}^\cdot$), süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroksil ($\text{ROO}^\cdot$), hidroperoksil ($\text{HO}_2^\cdot$) gibi radikaller bulunur. İkinci grupta ise hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen gibi ($^1\text{O}_2$) radikal olmayanlar bulunur. Genellikle birinci gruptaki ROS en toksik oksidan olarak tanımlanmıştır (Tian vd., 2021).

1.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücredeki serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize eden bileşiklerdir. Antioksidanlar yiyeceklerin ve içeceklerin içerisinde bulunurlar.

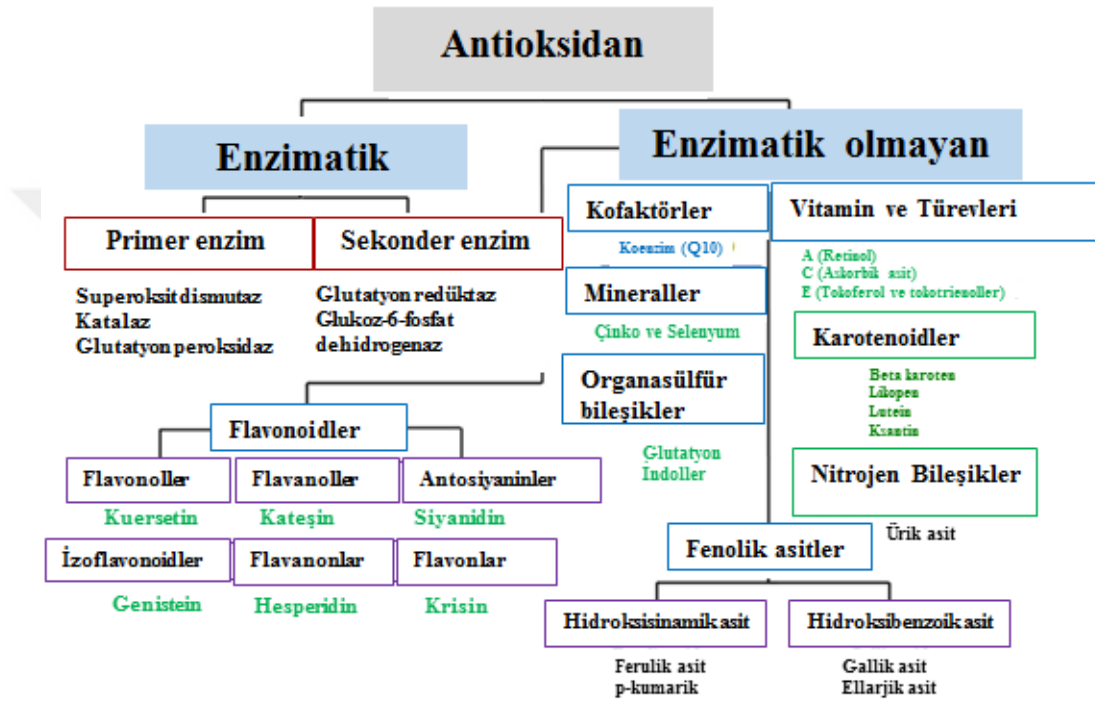
En önemli doğal antioksidan sınıfları olarak;

- Karotenoidler,
- Tokoferoller,
- Askorbik asit,
- Tokotrienoller,
- Flavonoidler,
- Fenolik asitler olarak sıralayabiliriz.

Kardiyovasküler hastalıklar, kalp hastalıkları, yaşlanma, anemi, ve kanser gibi birçok kronik hastalığın gelişiminde önemli rol oynayan serbest radikallerin

giderilmesinde ve verdikleri hasara karşı koruma sağlarlar (Zehiroglu ve Ozturk Sarıkaya, 2019).

Antioksidanlar kaynağına göre eksojen ve endojen, etkilerine göre ise enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere sınıflandırılırlar (Gulcin, 2012) (Şekil 1). Bazı enzimatik olmayan ürik asit, glutatyon ve CoQ10 gibi maddeler insan vücudunda sentezlenir ve ayrıca diyetel kaynaklardan elde edilebilirler. Polifenoller ise diyetlerden elde edilen ana antioksidan sınıfıdır (Ratnam vd., 2006).



Şekil 1. Antioksidan sınıflandırılması

1.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, serbest radikalleri parçalama ve uzaklaştırma yoluyla çalışırlar. Enzimatik antioksidanlar içerisinde katalaz (CAT), glutatyon s-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimler yer alır. Bakır, çinko, manganez ve demir gibi iyonlar bu enzimler için kofaktör işlevi görür. Enzimatik antioksidanlar, tehlikeli oksidatif ürünleri çok aşamalı bir yöntemle hidrojen peroksit (H_2O_2) ve ardında da suya dönüştürerek etki ederler (Carocho ve Ferreira, 2013; Nimse ve Pal, 2015). SOD ve CAT doğadaki bilinen antioksidan enzimlerden en güçlüleri arasındadır. SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonunu dönüşümlü olarak katalize eder. Ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda yaygın olarak bulunur. İnsandaki SOD'un, CuZn-SOD mitokondriyal, hücre dışı (Mn-SOD) ve ekstraselüler SOD olmak üzere üç tipi vardır. CuZn-SOD bir çok kanser türünde artış

gözlemlenirken, Mn-SOD düşüş gözlemlenir. Literatürde SOD'un akciğer kanseri ve meme kanseri üzerinde hücrel ölümü indüklediği bildirilmiştir. CAT, serbest radikal üretimi olmaksızın hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya ayrışmasını katalize eder. CAT vücutta bol bulunur. En yüksek aktivite gösteren CAT karaciğerde bulunur ve bunu eritrositler ardından da akciğer takip eder (Venkat Ratnam vd., 2006; Chang vd., 2018). Ayrıca, CAT gen aktivitesinin değişmesi kanser ve DNA hasarına duyarlılığı arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur. Hipertansiyon ve diabetes mellitus hastalarında CAT seviyesi düşüklüğü tespit edilmiştir (Aslankoç vd., 2019). GST prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunan detoksifikasyon enzimidir. GST toksin maddelerin glutatyon ile konjugasyonunda etkin rol oynar ve bu sayede oksidatif stresin zayıflamasına katkı sağlar. GST bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonların erken evresinde belirgin bir şekilde indüklenir. Bunun dışında bitkilerde büyüme, gelişme, fitohormon sinyali, hücre sinyali ve redoks homeostazının düzenlenmesi gibi bir çok etkisi mevcuttur (Gullner vd., 2018; Vaish vd., 2020). GR, okside glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüştürülmesini katalizleyen bu sayede GSH/GSSG oranını korumak için gerekli olan ve hücre içi savunmada görev alan antioksidan enzimidir. GSH seviyeleri ve GSH/GSSG oranı AIDS, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve diyabet gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bunlara ek olarak GSH hem'in detoksifikasyonunda kullanılır. (Kaya vd., 2019; Çoban vd., 2022).

1.2.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikal zincir reaksiyonlarını keserek çalışırlar. Bu gruptaki antioksidanlar, vitaminler (C, E), mineraller, fenolik asitler, polifenoller, karotenoidler, glutatyon ve sentetik bileşikler ((butillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG), bütillenmiş hidroksianisol (BHA)), yer almaktadır. Sentetik antioksidanlar gıdalara dahil edildiklerinde toksikolojik riskler taşıdıkları için kullanımları giderek azalma göstermektedir (Nimse ve Pal, 2015; Marchi vd., 2022). Polifenoller, bitkilerin meyve, sebze, yaprak, çiçek, tohum gibi kısımlarında bulunabilirler. Gıda maddelerinin tad, görünüş gibi kalite özelliklerinde ve doğal antioksidan olarak insan sağlığı üzerindeki önemli etkileri nedeniyle oldukça önemli bileşiklerdir (León-González vd., 2017). Yaralanma ve nöral dejenerasyona karşı önemli bir koruyucu etki gösteren biyolojik aktif bileşik grubudur. Fenolik bileşikler, süperoksit bazlı fenton reaksiyonlarını azaltma da bakır ve demir iyonlarını şelatlamayı sağlayan karboksil ve hidroksil gruplarına sahip olduğundan dolayı etkili antioksidanlar olarak kabul edilirler. Kendi içerisinde güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere

sahip olan flavonoid ve fenolik asit alt gruplarına ayrılırlar (Rodriguez-Arce ve Saldias, 2021; Zulfigar ve Ashraf, 2021).

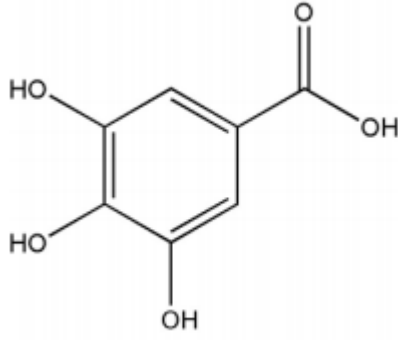
1.2.2.1. Fenolik Asitler

Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, yaprak, çiçek, tohum gibi kısımlarında bulunabilirler. Gıda maddelerinin tat, görünüş gibi kalite özelliklerinde ve doğal antioksidan olarak insan sağlığı üzerindeki önemli etkileri nedeniyle oldukça önemli bileşiklerdir. Fenolik asitlerin antioksidatif, antimutajenik ve antikanser gibi sağlığımız için birçok olumlu etkisi bulunmaktadır. Ayrıca, fenolik bileşikler kanserinde dahil olduğu kronik hastalıkların riskini azaltma, intestinal sağlığı koruma gibi insan sağlığı için çok sayıda fayda sunarlar. Fenolik bileşikler kendi içerisinde fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere ikiye ayrılır (Lee, 2011; León-González vd., 2017).

Fenolik asitler, bitkilerde bağlı ve serbest formlarda bulunabilen ve güçlü antioksidan olarak bilinen diyet fenollerinin yaklaşık üçte birini oluştururlar. Serbest radikal gibi hemen hemen tüm oksidan molekülleri sahip oldukları hidroksil grupları ile etki ederek antioksidan etki gösterirler (Sevgi vd., 2015). Bunun yanı sıra antioksidatif, antimutajenik ve antikanser gibi sağlığımız için birçok olumlu etkileri bulunmaktadır. Hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitlerin süstitüe türevleri yaygın olarak bitkilerde bulunan fenolik asitlerdir (Mattila ve Hellström, 2007; Cemeroğlu, 2009). Fenolik asitlerden kafeik asit, ferulik asit, kumarik asit ve analogları doğada yaygın bir şekilde bulunur. Fenolik asit türevleri antioksidan, antitromboz, antiinflamatuvar, antiviral aktiviteye sahiptirler (Lee, 2011).

Bitki ve mantarlarda sekonder metabolit olan fenolik asitler, ultraviyole ışık tarafından oluşan oksidatif strese, böcek, virüs ve bakteriye karşı koruma sağlarlar (Heleno vd., 2015).

Tez kapsamında çalışılan Gallik asit (GA; 3,4,5-trihidroksil-benzoik asit) ise doğada bulunan polifenollerden biridir. Gallik asit, çeşitli kansere türlerine karşı gelişimini ve ilerlemesini önleyen antioksidan özelliğe sahip önemli bir bileşiktir (Zhang vd., 2019; Khorsandi vd., 2020). Bunun yanı sıra, kardiyovasküler hastalıkları, nörodejeneratif bozuklukları ve yaşlanma dahil birçok bozuklukları tedavi edici özelliği olduğu bildirilmiştir (Pal vd., 2018). Gallik asit, Şekil 2’de gösterildiği gibi hidroksil gruplarının 3, 4 ve 5 konumlarında olduğu trihidroksibenzoik asittir. Gallik asidin propil gallat, oktil gallat, lauril gallat, tetradesil gallat ve heksadesil gallat gibi türevleri karboksil grubuna bağlı çeşitli uzunluktaki karbon zincire bağlı olarak değişkenlik gösterir (Gao vd., 2019).



Şekil 2. Gallik asidin açık formu

Gallik asit üzüm, nar, sumak, limon, muz, meşe kabuğu, ananas, elma kabuğu, çilek, kuruyemiş ve benzeri farklı gıdalarda bulunur. Bitki kaynaklarının yanı sıra çay ve şarap gibi bazı içeceklerde de bulunur. Bitkilerdeki Gallik asit miktarı, depolanma, radyasyona maruz kalma, mikrobiyal kontaminasyon gibi dış etkenlerden önemli ölçüde etkilenir. Bu nedenle, üzüm suyu ve şaraptaki Gallik asit içeriği değişkendir (Liao vd., 2018; Shabani vd., 2020). Gallik asit antitümör, antialerjik, antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar, antihiperglisemik ve antimutajenik gibi birçok önemli etkilere sahiptir. Bu etkilerinden dolayı akciğer, prostat, kolon, mide ve servikal kanseri dahil birçok kanser türünde antikanser etkisi rapor edilmiştir (Patel ve Goyal, 2011; Liao vd., 2018)

1.3. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (CA) (EC 4.2.1.1) enzimi $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 'ın hidratasyon/dehidratasyonunu geri dönüşümlü olarak katalizleyen, neredeyse yaşayan tüm organizmalarda yaygın olarak bulunan metalloenzimlerdir. Memelilerden önemli fizyolojik rolleri olan yaklaşık on altı farklı α -CA izoformu izole edilip karakterize edilmiştir.

Karbonik anhidraz (CA) şöyle sıralayabiliriz:

- Sitozolik (CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAXIII),
- Membrana bağlı (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV ve CAXV),
- Mitokondriyal (CAVA ve CAV),
- Tükürük bezinden (CAVI) sekrete edilir,
- İnsanlarda ve diğer primatlarda eksprese edilmeyen (CAXV) ancak rodent ve diğer yüksek vertebralarda bol miktarda bulunur (Alterio vd., 2012; Kumar vd., 2021).

Son yıllarda tümör hücrelerini sınırlandırmak ve yok etmek için yeni farklı hedefler ortaya çıkmıştır. Bu hedefler arasında bulunan en önemli enzim ailelerinden

biri olan karbonik anhidrazilara yönelik yeni ilaçların geliştirilmesinde hedef proteinler olarak kanser tedavisinde yer almışlardır (Supuran, 2007; Winum vd., 2008). Karbonik anhidrazlar, pH dengesi, iyon transportu, respirasyon, glukoneogenezis, renal asidifikasyon, serebrospinal sıvı oluşumu, kemik rezorbsiyonu gibi biyolojik olaylarda görev alırlar (Scozzafava vd., 2006; Supuran, 2007).

CA izoformlarının anormal seviyeleri veya aktiviteleri kanser gibi farklı hastalıklara ilişkilendirilmiştir. CAI ve CAII memeli kırmızı kan hücrelerinde bulunan iki ana CA izoformudur (Innocenti vd., 2008). CAII, tüm CA'ların içinde en yüksek turnover oranına sahip ve en çok çalışılan 29 kDA ağırlığında monomerik bir proteindir ($k_{cat} = 106 \text{ s}^{-1}$) (Silverman ve McKenna, 2007; Aggarwal vd., 2013). CAIX ve CAXII pH düzenleyen enzimlerdir ve her ikisinde potansiyel antikanser hedefleri olarak kullanılabilirler. Bu izoenzimlerin yüksek katalitik aktiviteleri sayesinde tümör mikroçevresinde asidifikasyonu sağlamaları ile tümör hücrelerinin ekstrasellüler matrix boyunca ilerlemesi kolaylaşmaktadır (Doyen vd., 2013; Kallio vd., 2006). Kanserlerin belli tiplerinde CAIX overekspresyonu, kanser diyagnozu ve prognozu için CAIX'un biyobelirteç olarak kullanılmasını sağlar (Aggarwal vd., 2013). CAIX yüksek bir oranda özofagus, böbrek, akciğer ve meme gibi bazı tümör dokularında eksprese olur. Diğer yandan normalde yüksek miktarda CAIX eksprese eden mide ve safra kesesi gibi dokular tümör oluşumunda bu ekspresyonlarını kaybederler (Kallio vd., 2006). CA enzim aktivitesinin anormal seviyelerde olması obezite, epilepsi, glokom, kanser ve birçok hastalıkla ilişkilidir. Bu hastalıkların tedavisinde etkin karbonik anhidraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Karbonik anhidraz inhibitörü olan sülfonamid türevleri glokom tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu nedenlerden dolayı karbonik anhidraz enzim inhibitörleri bazı hastalıkların tedavisi için önem arz etmektedir (Ergün ve Karataş, 2020).

1.4. Kanser

Kanser, denetimsiz oluşan hayatı tehdit eden bir hastalık grubudur. Hücrelerin çoğalmasını ve çevresini istila eder, metabolik, anjiyojenetik ve immünolojik fonksiyonları bozar (Hanahan ve Weinberg, 2011; Alterio vd., 2012). Dünya Sağlık Örgütüne Göre (WHO), kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. 2012'e kadar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde 8.2 milyon ölümle sonuçlanmıştır (Winum vd., 2012).

Kanser için tipik tedaviler arasında cerrahi, radyasyon tedavisi ve kemoterapi tek başına veya kombinasyon halinde kullanılabilir. Cerrahi çoğu kanser türünde özellikle

kötü huylu tümörler için birincil tedavi olarak kabul edilir, lakin ameliyat esnasında tümörün yakınındaki sağlıklı dokuların bir kısmının çıkarılmasını da içerir. Radyasyon tedavisi, tümörleri küçültmek ve hücrelerini öldürmek için yüksek enerji parçacıkların ya da dalgaların (gama ışınları, x-ray, elektron ışınları ve protonlar) uygulanmasıdır. Ameliyat gibi radyoterapide lokal bir tedavidir, sadece tedavi edilen bölgedeki kanser hücrelerini etkileyebilir. Kemoterapi ise çok çeşitli kanserler için en yaygın ve etkili tedavilerden birisidir, kanser hücrelerinin büyümelerini, çoğalmalarını ve yayılma hızlarını engelleyerek yok etmek için bir veya daha fazla kemoterapötik ajanlar kullanılır (Pashaei vd., 2020).

Çok sayıda antikanserinin yan etkisi ve az etkisine rağmen en etkili kinaz inhibitörleri başarı sağlar (Touisni vd., 2011). Bu yüzden daha etkili daha güvenilir marjinal ilaç geliştirme yöntemlerine istekler artar (Vander Heiden vd., 2009; Supuran, 2016).

1.4.1. Akciğer Kanseri

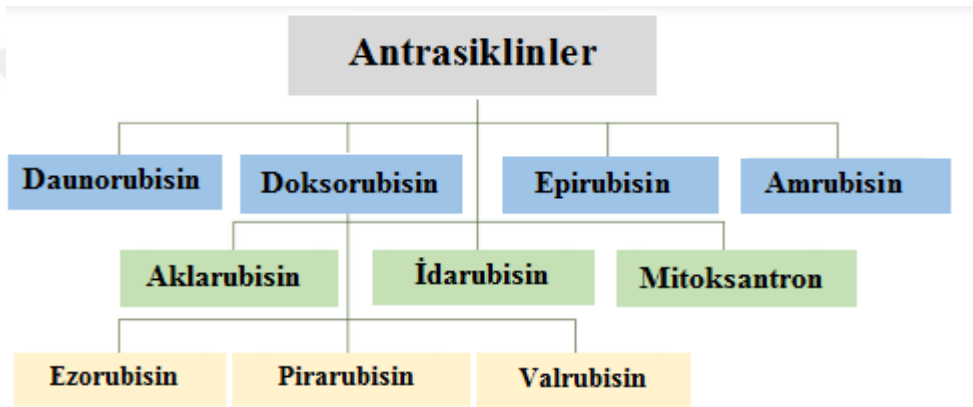
Akciğer kanseri 2018 yılında yaklaşık 2.1 milyon yeni vaka ortaya çıkmıştır ve dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin (% 18.4) yüksek ölüm oranıyla akciğer kanseri 1.sırada yer alır. Yüksek ölüm oranı nedeniyle akciğer kanseri önemli bir evrensel halk sağlığı sorunu olmaya devam eder (Karimpour vd., 2021). Akciğer kanserinin başlıca türleri arasında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve mezotelyoma bulunur. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), adenokarsinom (ADC), skuamöz hücreli karsinom (SCC) ve büyük hücreli karsinom olarak alt bölümlere ayrılabilir (Whittle vd., 2022).

NSCLC, akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80-85'ini oluşturur. NSCLC için farklı tedavi seçenekleri mevcuttur. Evre I ve evre II aşamasındaki hastalar için ilk tedavi seçeneği cerrahi yöntem yer alır. Bununla birlikte, hastalığı ilerlemiş hastalarda ise platin bazlı ikili tedavi (bevacizumab ile bevacizumab olmayan) kanser ilaçları tedavinin birinci basamağında yer alır (Zhang vd., 2021; Desai vd., 2022).

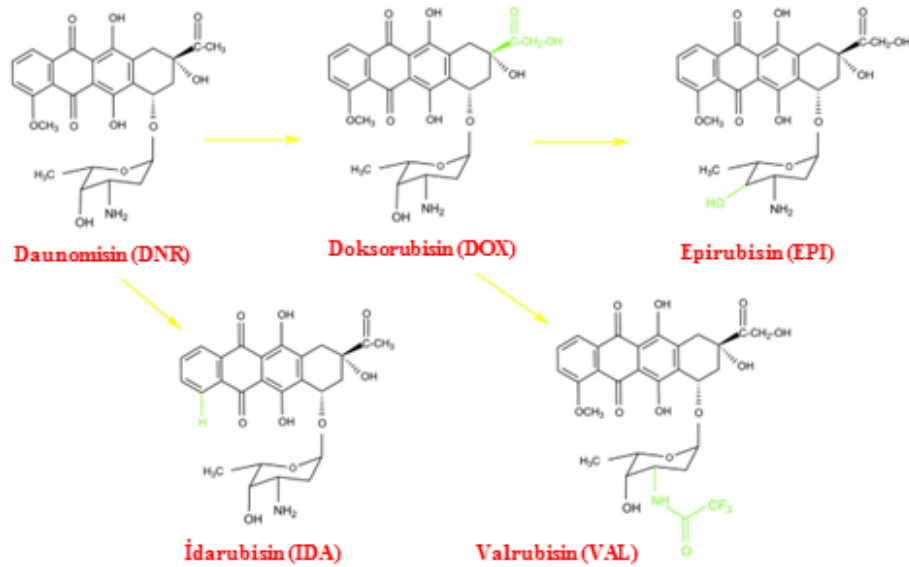
Akciğer kanserinin teşhisindeki kanserin tespit edilmesinin zor olması, kanserin ilerlemesine ve tedavinin etkinliğinin azalmasına neden olur (Yin vd., 2021). Mevcut tedavi yöntemleri ile birlikte kanser immünoterapisinin deki son gelişmeler akciğer kanseri hastalarına umut verici olsa da hastaların büyük bir kısmı mevcut tedaviye duyarsız olması ya da tedavi sırasında direnç göstermesinden dolayı ilaçların etkisini azaltır (Zhang vd., 2021). Bu nedenle, yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesi kritik öneme sahiptir.

1.4.2. Kanser Tedavisinde Kullanılan Kemoterapi İlaçları

Günümüzde kanser görülme oranlarının artmasıyla birlikte sitotoksik kemoterapi ilaçlarının tedavide kullanım oranları artmaktadır. 50 yıldan fazla bir süre önce keşfedilen antrasiklinler (ANT) başlangıçta antibiyotik olarak geliştirilen ve Dünya Sağlık Örgütü temel ilaçlar listesinde yer alan güçlü sitotoksik kemoterapi ilaçlarıdır. Bu ilaçlar lenfoma hastalarının (% 55-70), meme kanseri hastalarının (% 32) ve çocukluk kanserlerinin (% 50-60)'nın tedavisi dahil birçok kanser türünün tedavisinde kullanılır. Daunorubisin (DNR), doksorubisin (DOX), epirubisin (EPI), idarubisin (IDA) ve valrubisin (VAL) dünyada en sık kullanılan ANT ilaçlarıdır (Pashaei vd., 2020). Şekil 3'te şematize edilmiştir ve Şekil 4'te molekül yapıları belirtilmiştir.



Şekil 3. Antrasiklinlerin sınıflandırılması



Şekil 4. Antrasiklin grubu kemoterapi ilaçlarının molekül formülleri (Pashaei vd., 2020).

Daunomisin (DNR), Solid tümörlerden ziyade yetişkin akut lenfositik lösemisinin tedavisinde kullanılan tümör ilacıdır. DNR, moleküler oksijen ile etkileşime girerek reaktif oksijen türleri (ROS) üretir ve topoizomera II inhibisyonu ve DNA eklentilerinin oluşumunu sağlar (Al-Aamri vd., 2019). Doksorubisin (DOX), geniş spektrumlu ve güçlü bir sitotoksiktir. Akut lenfoblastik lösemi, miyeloblastik lösemi, yumuşak doku ve kemik sarkomları, nöroblastom, hodgkin ve malign lenfoma ve birçok karsinom türü dahil olmak üzere meme, yumurtalık, tiroid, mide, bronkojenik ve geçiş hücreli mesane gibi çeşitli insan kanserlerinin tedavisinde kullanılır. İdarubisin (IDA) ise miyeloid lösemi, multipl miyeloma, akciğer, yumurtalık ve ileri meme kanser türleri için kullanılan diğer antitümör ilacıdır (Pashaei vd., 2020). DOX'un yarı sentetik türü olan Valrubisin (VAL), ANT ile kıyaslandığında daha lipofilik bir yapıya sahiptir. Suda az çözünür ve bundan dolayı hücre zarını daha hızlı geçerek hızlı etki eden tümör ilacıdır (Tang ve Chang, 2015). Son olarak, Epirubisin (EPI) amino şeker üzerindeki 4'-hidroksil grubunun inversiyonunu içeren DOX'un modifikasyonudur. DOX ile eşdeğer etkiye sahip olmasına rağmen fazla glukuronidasyona sahip olduğu için idrarda daha kolay elimine edilir ve bu yüzden daha az toksiktir (Capelo vd., 2020).

Akciğer kanserinin kemoterapi tedavisinde platin bazlı tedavi kullanılır ve genellikle tübülün bağlayıcı taksan (paklitaksel, dosetaksel), loidler (vinorelbin, vinristinel), kamptotesin (irinotekan, topotekan), gemsitabin ve pemetreksed kullanılır (Chang, 2011).

1.4.2.1. Dosetaksel

Dosetaksel (DOC), Taxus cinsi bitkiler tarafından üretilen diterpenleri olan taksan ailesine ait antikanser ilaçlarından birisidir (Zhao ve Astruc, 2012). Paklitaksel gibi, Dosetaksel da β -aktin'e geri dönüşümsüz olarak bağlanan ve sonuç olarak mikrotübül polimerizasyonunu değiştiren ve hücre mitozunu parçalayan ve apoptozu tetikleyen yarı sentetik bir malzemedir (Gallego-Yerga vd., 2017). Dosetaksel mikrotübüllerin depolimerleşmesini engelleyebilen hücre döngüsüne özgü antitümör ilacıdır, küçük hücreli akciğer kanseri için birinci ve ikinci basamak tedavi olarak kullanılır. Bunun yanı sıra, Dosetakselin ciddi aşırı duyarlılık reaksiyonları, nefrotoksisite ve kardiyotoksisite dahil yan etkileri vardır (Wu vd., 2017). Dosetaksel tek başına ve diğer kemoterapötiklerle kombine olarak prostat kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, baş ve boyun kanseri ve gastrik adenokanser gibi birçok tümörün tedavisinde kullanılır (Chew ve Chuen, 2009). Dosetaksele dayalı tedavi, akciğer kanserinde hormona dirençli olan hastalarda bir seçenektir ve hastaların sağ

kalımını arttırdığı gösterilmiştir (Thambiraj vd., 2019). Dosetaksel, özellikle belirtmek gerekir ki üçlü negatif meme kanseri (TNBC) alt tipi meme kanseri vakalarının % 15-20'sinde neoadjuvan tedavisinin önemli bir bileşenidir (Nohr-Nielsen vd., 2020).

1.4.2.2. Mitoksantron

Mitoksantron (MIX), trisiklik düzlemselden oluşan kromofor ve iki temel yan zincire sahip simetrik bir ilaçtır. Bu antrasiklin grubuna ait ilaç önemli bir antineoplastiktir. Mitoksantron hem sağlıklı hücrelerde hem de kanser hücrelerinde DNA çift sarmal kırılmalarına yol açan mitokondriyal yolun inhibisyonu ve topoizomerez II'in inhibisyonu yoluyla programlanmış hücre ölümünü veya apoptozu indükler. Mitoksantron miyeloid lösemi, meme kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanseri dahil farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Al-Otaibi vd., 2018; Sargazi vd., 2018). Mitoksantron yan etkilerinin araştırılmasında, hastalara denendikten sonra lökosit değerlerini düşürmüş kardiyak toksisiteye sebep olmuştur (Morrissey vd., 2005). Mitoksantron tedavisi ile bulantı, alopesi, kusma, geçici lökopeni, üriner ve solunum sistemi enfeksiyonları, amenore, flebit, anemi, infertilite, karaciğer fonksiyonlarında bozulma gibi hafif ve orta şiddetteki yan etkiler sıklıkla (Fox, 2006; Martinelli vd., 2009).

1.4.3. Kemoterapi İlaçlarının Yan Etkileri

Kanser tedavilerinde en çok kullanılan ilaçlar kemoterapik ilaçlardır. Bunların fayda zarar ilişkisi her zaman tartışılan bir konu olmuştur (Anai vd., 2019). Platin bazlı ilaçlar içerisinde yer alan sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin kanser tedavisinde düzenli olarak kullanılan kemoterapi ilaçlardır. Bu ilaçların kanser üzerine önemli etkileri olmasına rağmen 40'a yakın yan etkileri mevcuttur. Sisplatin için doz sınırlayıcı yan etki nefrotoksiste, karboplatin için miyelosupresyon ve oksaliplatin içinse nörotoksitedir. Diğer yaygın yan etkiler arasında, sitopeni, anafilaksi, ototoksiste, hepatotoksiste, kardiyotoksiste, bulantı, kusma, diyare, stomatit, mukozit, ağrı, alopesi, anoreksi, kaşeksi ve asteni yer alır (Oun vd., 2018). *Streptomyces peucetius* kültüründen izole edilen doksorubisin, güçlü bir antikanser ajandır. Kolon, meme, karaciğer, lenfoma gibi birçok kanser türünde kullanılmasına rağmen birçok organda (kalp, beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, iskelet kası) kullanımı doza bağımlı toksisite ile sınırlıdır. Sıklıkla kardiyomiyopatiye yol açar. Sunitinib ve Trastuzumab ise sıklıkla kardiyotoksisiteye yol açan toksik yan etkileri vardır (Gorini, vd., 2018).

Çalışmamızda kullanılan Dosetakselin nötropeni, periferik nöropati ve hipersensitive reaksiyonları gibi sistemik yan etkileri ve fotosensitive, alopesi ve lupus benzeri döküntü yan etkileri vardır (Şen vd., 2017). Diğer kemoterapi ilacı olan Mitoksantronun ise üriner sistem enfeksiyonu, alopesi, bulantı, nötropeni, halsizlik ve geçici amenore gibi yan etkileri mevcuttur (Taşkapılıoğlu vd., 2012).

1.4.4. Önceki Çalışmalar

Nouri vd. (2021)'de, Gallik asidin toksik madde olan Parakuat'ın neden olduğu böbrek hasarına ve oksidatif strese karşı etkisini incelemişlerdir. Araştırmada sıçanlar altı gruba ayrılmıştır. Grupları kendi içerisinde, 1. grup (kontrol), 2. grup (Parakut alan), 3. grup (Gallik asit alan), 4. grup (25 mg/kg Gallik asit + Parakuat), 5. grup (50 mg/kg Gallik asit + Parakuat) ve 6. grup (100 mg/kg Gallik asit + Parakuat) olarak sınıflandırmışlardır. Çalışmanın bulgularında, Gallik asidin SOD ve CAT seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını ve serum kreatinin, üre, ürik asit, sGOT ve sGPT dikkate değer bir düşüşe yol açtığını tespit etmişlerdir. Ayrıca histolojik değişiklikler Gallik asit sayesinde düzelmiştir. Çalışma Gallik asidin Parakuat maruziyeti sonucu ortaya çıkabilecek zararlı etkileri antioksidan enzim aktivitesini artırarak azaltabileceğini göstermiştir (Nouri vd., 2021).

Gholamine vd. (2021)'de, Gallik asit sodyum arsenik (SA)'ın neden olduğu renal ve hepatik toksisiteye karşı etkilerini incelemişlerdir. Otuz beş sıçan rastgele beş gruba ayrılmıştır. 1. grup (2 ml/kg/gün salin), 2. grup (10 mg/kg/gün sodyum arsenik), 3 ve 4. grup (10 ve 30 mg/kg/gün;7 Gallik asit) ve 5. grup (30 mg/kg/gün;21 Gallik asit) olarak sınıflandırılmıştır. Çalışma bulgularında, Gallik asit ile tedavi hematolojik ve histopatolojik parametrelerde sodyum arsenik kaynaklı toksisiteyi iyileştirmiştir. Ayrıca, GPx, SOD ve CAT aktivitelerini arttırmıştır. Gallik asidin antioksidan kapasiteyi koruyarak ve artırarak reaktif serbest radikalleri gidermiştir. Çalışma sonucunda Gallik asit, sodyum arseniğin neden olduğu böbrek ve karaciğer toksisitesini önleyebileceğini göstermiştir (Gholamine vd., 2021).

You vd. (2019)'da, Gallik asidin reaktif oksijen türleri (ROS) ve glutatyon (GSH) ile ilişkili olarak Calu-6 ve A549 akciğer kanser hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Gallik asit 24 saat boyunca 10-50IM ve 100-200IM Gallik asit, IC50 ile Calu-6 ve A549 hücrelerinin büyümesini azaltmıştır. Ayrıca, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybının eşlik ettiği akciğer kanser hücrelerinde hücre ölümünü indüklemiştir. N-asetil-sistein ile Gallik asit uygulandığında hücre ölüm oranı artmıştır. C vitamini Gallik asit uygulanmış akciğer kanser hücrelerinin hücre ölümü, ROS

düzeyleri ve GSH tükenmesi önemli ölçüde azalmıştır. L-butyonin sülfoksimin Gallik asit ile tedavi edilen akciğer kanser hücrelerinde büyüme inhibisyonu ve ölüm oranını hafifçe arttırmıştır. Ayrıca, ROS seviyesi ile GSH tükenmesini de hafifçe arttırmıştır. Çalışma sonucunda, Gallik asit akciğer kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini tespit etmişlerdir (You ve Park, 2010).

Micheli vd. (2021)'de, nöroblastoma hücrelerinde Dosetaksel'in neden olduğu redoks dengesizliğini ve Dosetaksel tarafından indüklenen nöronal hasarı tespit etmeye çalışmışlardır. Nöroblastoma hücreleri 6 saat boyunca 1.25 nM'lık dozda Dosetaksle maruz bırakılmıştır. Deney sonucunda, nöroblastoma hücrelerinde Dosetaksel, toplam glutatyon ve askorbik asitte önemli bir azalmaya neden olmuştur. Ayrıca antioksidan maddelerin azalmasına bağlı olarak apoptotik hücrelerin artmasına neden olmuştur. Ayrıca, subletal Dosetaksel dozu antioksidan tepkinin spesifik olmayan modülasyonu sonucunda redoks dengesizliğini indüklemiştir. Deney sonucunda, Dosetaksle maruz kalan hücrelerde askorbik asidin azalması, AA'nın GSSG üzerindeki koruyucu etkisini azaltmıştır. Dosetaksel ile tedavi edilen nöroblastoma hücrelerinde, ROS'un fazla olması ve GH'nin azalması antioksidan kapasitesinde dengesizliğe yol açmıştır (Micheli vd., 2021).

Shokrzadeh ve Ghassemi-Barghi (2018) yılında, HepG2 hücrelerinde amifostin'in Mitoksantronun neden olduğu toksisiteye karşı etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, Mitoksantron DNA sentezinin indüksiyonuna ve inhibisyonuna, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artışa ve hücre içi glutatyonun tükenmesine neden olmuştur. Amifostin, ROS üretimini bloke ederek ve hücre içi glutatyon seviyesini artırarak Mitoksantronun neden olduğu olumsuz etkileri azaltmıştır (Shokrzadeh ve Ghassemi-Barghi, 2018).

Adamczyk-Sowa vd. (2012)'de, multiple skleroz hastalarında Mitoksantron tedavisi sonrası antioksidan aktivitesi durumunu araştırmışlardır. Mitoksantron tedavisinden sonra beyin omurilik sıvısında MnSOD aktivitesi azalmış ve Cu/ZnSOD aktivitesi artmıştır. Ayrıca Mitoksantron tedavisinden sonra CAT ve GSH-Px aktivitesi belirgin bir şekilde azalmıştır. Yaptıkları çalışma sonucunda, Mitoksantron tedavisinin serum ve BOS'un antioksidan enzim aktivitelerini etkilemiştir ve oksidasyon/antioksidasyon durumunu değiştirmiştir (Adamczyk-Sowa vd., 2012).

Sheweita vd. (2018)'de, sıçanlarda tramadol kaynaklı hepato ve nefrotoksisiteye karşı zerdeçal ve Gallik asidin antioksidanlar olarak etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, tramadolun neden olduğu katalaz (CAT), glutatyon s-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon redüktaz (GR) seviyelerindeki azalma

Gallik asit-zerdeçal tedavisinden sonra normal seviyelere dönmüştür. Ayrıca kontrol grubuna göre N demetilaz (DMN-dI) ve aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) aktiviteleri artmıştır. Gallik asit ve zerdeçal'ın kullanılması antioksidan enzimler üzerinde olumlu etki oluşturmuştur (Sheweita vd., 2018).

Gallik asit, Dosetaksel ve Mitoksantronun antioksidan enzimler üzerine etkileri yukarıdaki çalışmalarla örneklendirilmiştir. Karbonik anhidraz enzimler üzerine yapılan çalışmalar ise aşağıda verilmiştir.

CAI sakroiliak ve omurilik eklemlerde anormal kemik oluşumu ile karakterize olan Ankilozan spondilit hastalığında *in vitro* da kalsiyum presipitasyonuna neden olmaktadır. Ferraroni vd. (2002)'de CAI'in yeni kemik formasyonunda ve biyomineralizasyon önemli rolü olabileceğini söylemişlerdir (Ferraroni vd., 2002). CAI'in prostat kanserinde önemli biyomarker olan prostat spesifik antijen (PSA) gibi tanıda görev görebileceği ve hasta bireylerde CAI seviyesinin sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek olduğu dolayısıyla CAI'in bu hastalıkta bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Takakura vd., 2012). Ayrıca Gao ve grubunun yaptığı bir çalışmada ise retina ve beyin ödeminde CAI'in bulunduğu ve CAI inhibisyonunun bu durumda değerli bir araç olabileceği gösterilmiştir (Gao vd., 2007).

Kanser hücre mikroçevresinin koşullarını andıran *in vitro* hücre kültüründe endotelial hücrelerde CAII ekspresyonunun arttığı gösterildi (Hynninen vd., 2012). Yoshiura vd. (2005)'de, CAII'nin özofagal, akciğer, renal, ve melanom kanserlerinin tümör damar endotelinde eksprese olduğunu göstermiştir (Yoshiura vd., 2005). Parkkila vd. (2010)'da ise CAII'nin gastrointestinal stromal tümörlerde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (Parkkila vd., 2010).

Chiang vd. (2002)'de küçük hücreli akciğer kanserinde sitozolik CA enziminin klinik önemini araştırmışlardır. Sitozolik karbonik anhidraz ve küçük hücreli akciğer kanseri ekspresyonu arasındaki olası ilişkiyi aydınlatmak amacıyla 70 kanser hastasında CAI ve CAII nin aktivite ve protein ekspresyonu analiz etmişlerdir. Sonuç olarak CA aktivitesinin protein ekspresyonu hem skuamöz hücreli karsinom hemde adenokarsinom da önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir. CAI ve CAII azalması tümör hücresi hareketliliğini arttırdığını ve tümör büyümesini ve metastazına katkı sağladığı verilerini elde etmişlerdir. CAII enziminin akciğer tarafından CO₂ ektrafüzyonunda rol oynadığını insanlarda kalıtsal CAII eksikliği şiddetli asidoza neden olduğunu ve bunun da akciğer kanseriyle ilişkilendirmişlerdir (Chiang vd., 2002).

Simi vd. (2005)'de küçük hücreli akciğer kanserinde mRNA ekspresyonun CAIX arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Oksijensiz kalan akciğer hücreleri hayatta

kalabilmek için hipoksiye başvururlar. CAIX hipoksinin bir belirtici olarak, hipoksiye maruz kalan 93 akciğer hücrelerinde denenmiş ve % 76'da CAIX değerlerini diğer dokulardaki CAIX değerlerine oranla daha yüksek tespit etmişlerdir (Simi vd., 2005).

Malentacchi vd. (2008)'de küçük hücreli akciğer kanserinin belirlenmesinde CAIX enzimini üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Hipoksi durumunda hücre içi ve dışı arasındaki pH dengesinin sağlanmasında CAIX enziminin etkisi olduğunu, tümör hücresi yayılmasında ve ilerlemesinde de etken olduğunu bundan dolayı hipoksi durumunda 101 akciğer kanser hücresinde çalışmalar yapılmış ve yaklaşık % 60'da CA enziminin değerleri hipoksiye maruz kalmayan hücrelerden daha yüksek bulunmuştur (Malentacchi vd., 2008).

Stewart vd. (2014)'de küçük hücreli akciğer kanserinin 1 ve 2. Evrelerinde CAIX enzimiyle arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Farklı hasta gruplarında skuamöz hücreli karsinom ile adenokarsinom arasında kıyas yapmış ve skuamöz hücreli karsinomda CA seviyelerini daha yüksek elde etmişlerdir. Ayrıca yüksek evre tümör hücrelerinde CA seviyelerini daha yüksek oranda elde etmişlerdir (Stewart vd., 2014).

Fenolik bileşiklerin aynı zamanda CAI, II, IX ve XII enzimleri üzerinde inhibitör etkisi gösterdikleride bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada Gallik asit, elajik asit, ferulik asit, kafeik asit, kersetin, p-hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit ve syringic asit gibi fenolik asitlerin ki değerlerinin hCAI için 105–758 μ M hCAII için 99-1061 μ M aralığında değiştiği gözlenmiştir. hCAI için en etkili inhibitörler kuersetin, elajik ve kafeik asit hCAII için ise ferulik asit, kuersetin ve elajik asit olmuştur (Ozturk Sarikaya vd. 2010). Fenolik bileşikler ile ilgili benzer bir çalışma da p-hidroksibenzoik asit, ferulik asit, gallik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, syringic asit, kuersetin ve ellajik asit gibi bileşiklerin insan (h) yada fare (m) kaynaklı tüm memeli izozimleri, hCAI, hCAXII, mCAXIII ve hCAXIV, üzerinde düşük mikromolar aralığında inhibitör etkisi gözlemlenmiştir (ki: 0.87-7.79 μ M). Fenolik maddeler içerisinde p-hidroksi benzoik asit (ki:3.73 μ M) p-kumarik asit (ki:5.33 μ M) CAIX enziminin en iyi inhibitörleri olarak bulunmuşlardır (Innocenti vd. 2010).

CA enzimleri ve Gallik asidin CA enzimi üzerine etkileri bakımından yapılan çalışmalar yukarıda verilmiştir. Gallik asidin kanser ve farklı yapılar üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar ise aşağıda verilmiştir.

Jang vd. (2020) yılında, tümör baskılayıcı gen transkripsiyon tarafından kontrol edilen Histon deasetilaz (HDAC), çeşitli tümörlerde aşırı eksprese edilip tümör gelişimi ve ilerlemesini etkilediğinden Gallik asit ile çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, prostat kanser hücrelerinde HDAC1 ve 2'nin ekspresyonunu modüle ederek Gallik asidin

prostat kanseri (Pca) ilerlemesini inhibisyon etkisini göstermişlerdir. Pca hücre hatlarının hücre canlılığını azalttığını ve ayrıca koloni ve tümör sferoid oluşumunu inhibe etmiştir. Gallik asit maruz kalma sonucu, mitokondriyal membran potansiyeli azalmış, apoptotik hücre sayısı artmış ve DNA fragmatasyonu indüklemiştir. Western blot analizi ile HDAC1 ve 2'nin düzeylerinde azalma olduğu tespit etmişlerdir. P53 geninde yukarı düzeyde artış olmuş, siklin D1 ve E1, hücre döngüsünü durdurma geni olan p21 ekspresyonunu regüle etmiştir ve Bax, Bcl-2, bölünmüş kaspaz-3 ve poli (ADP-riboz) polimeraz 1 gibi apoptoz intrinsik yola bağlı genleri düzenlemiştir. Ayrıca, PC-3 hücrelerinde türetilmiş tümöre sahip farelere oraldan 8 hafta boyunca Gallik asit verilmesi sonucu, tümör boyutu küçülmüş, tümör yapısına zarar verdiği histolojik analizlerle tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, Gallik asidin HDAC1 ve 2 ekspresyonu inhibe ederek Pca ilerlemesini engelleyebileceği ve böylece Gallik asidin HDAC inhibitörü ve anti-Pca terapötik olarak kullanım potansiyeli olacağını göstermiştir (Jang vd., 2020).

Sunil Gowda vd. (2018) yılında, Epitelyal-mezenkimal (EMT) geçişli metastazı önlemek amacıyla Gallik asit-gümüş naoparçacık (GA-AgNP) formunda sentezleyerek akciğer kanser hücresi üzerine çalışma yapmışlardır. A549 hücreleri, 8Gy (X ışını) ile ışınladı ve *in vitro* koşullar altında sabit konsantrasyonda GA-AgNP ile işlenmiştir. Işınlamadan sonra, morfoloji değişikliği ters mikroskop ile gözlemlenmiş, EMT işaretleyiciler gen ve protein ekspresyonunu RT-PCR ve western blotlama ile analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda, sentezlenen nanopartiküller, Vimentin, N-kaderin, Snail-1 dahil olmak üzere EMT markırları baskılandığını ve E-kaderin miktarını arttırarak kanser hücrelerinin metastaz potansiyelini engellediğini bulmuşlardır (Sunil Gowda vd., 2018).

Liao vd. (2018) yılında, Gallik asidin yağ asidi sentaz (FAS) aktivitesini inhibe ettiğini ve TSGH-8301 mesane kanser hücresinin ER alfa aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Gallik asit, hücre PI3K/AKT ve MAPK/ERK yoluyla hücre çoğalmasını düzenlemiştir. İmmüno çöktürme deneyi sayesinde, Gallik asidin Skp2 protein seviyesini azalttığını ve Skp2-p27 ilişkisini zayıflattığını göstermişlerdir. Gallik asidin p27 seviyelerini kontrol etmek için proteazomun yukarısında hareket ettiğini ve G2/M fazına geçişini inhibe ettiğini öne sürülmüştür. Çalışma sonucunda, Gallik asidin yağ asidi sentazın inhibisyonu yoluyla TSGH-8301 mesane kanseri hücre büyümesini, yayılmasını ve göçünü inhibe ettiğini göstermişlerdir (Liao vd., 2018).

Sales vd. (2018)'de, Terminalia bellarica (T. Bellarica) şifalı bitkisinin metanolik meyve özünden elde edilen Oktil gallat (OG) ve Gallik asidin (GA) etkisini

incelemişlerdir. Meme kanser hücrelerinin hayatta kalmasını engellemek amacıyla 40 uM Oktil gallat ve 80 uM Gallik asit uygulamışlardır. IC₅₀ değeri, meme kanser hücrelerinin sağ kalımında azalma ve apoptozun indüklenmesini tespit etmişlerdir. Ayrıca hücre döngüsünde, (Siklin D1, D3, CDK-4, CDK-6, p18 INKA4, p21 ve p27) aşamalarında hücre döngüsünü engellediklerini tespit etmişlerdir (Sales vd., 2018).

You vd. (2010)'da, Hela hücrelerinin hücre büyümesi ve ölümü üzerine Gallik asidin etkilerini incelemişlerdir. Hela hücre büyümesi, insan göbek endotelial hücrelerinde Gallik asit IC₅₀ yaklaşık 400 IM iken 24 saatte IC₅₀ 80IM Gallik asit azalmıştır. Hela hücrelerindeki mitokondriyal membran potansiyel kaybına takiben apoptoz ve nekroz uyarılmıştır. Test edilen tüm kaspaz inhibitörleri (kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 inhibitörü) Gallik asit indüklenmiş hücre ölümünden Hela hücreleri önemli ölçüde azalmıştır. Gallik asit, Hela hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesini ve GSH (glutasyon) hücre sayısını azaltmıştır. Sonuç olarak, Gallik asit, apoptoz veya nekroz yoluyla Hela hücrelerinin büyümesi engellemiştir. Gallik asit kaynaklı Hela hücre ölümüne, ROS artışı ve GSH tükenmesi eşlik etmiştir (You vd., 2010).

Gallik asit ile Dosetaksel ve Mitoksantron kombinasyonun antioksidan enzim ve CA enzimi üzerine yapılan çalışmalar bulunamamıştır. Bununla beraber farklı fenolik bileşikler ve farklı kemoterapi ilaçları ile ilgili çalışmalara rastlanmıştır.

Fenolik bileşiklerden biri olan ferulik asit çeşitli meyvelerde bulunan insülin direnci ve hipertansiyon üzerine terapötik bir etkiye sahip olan doğal bir polifenolik ajandır. Bami ve arkadaşları (Bami vd., 2017) ferulik asidin sıçanlarda sisplatin kaynaklı nefrotoksisitesini antioksidan ve nefroprotektif etkisiyle iyileştirdiğini bildirmiştir. Sassa ve diğ. (Sassa vd., 2003), ferulik asidin yumurtalıkları alınmış sıçanlarda kemik kaybı üzerine koruyucu olarak etkilerini bildirmişlerdir. Asano ve diğ. (Asano vd., 2017) ferulik asidin hayvanlarda kronik serebral hipoperfüzyona bağlı yutma disfonksiyonu için terapötik potansiyelini göstermiştir. Gerçekten de, yeterli ferulik asit takviyesi birçok kronik hastalığı önlemektedir (Zhao vd., 2004). Balasubashini vd. (Balasubashini vd., 2004) ferulik asit desteğinin, streptozotosin ile indüklenen diyabetli sıçanlarda lipid peroksidasyonunu önlediğini, Sagar ve arkadaşları (Zhao vd., 2004) ise ferulik asidin olgun osteoklastların füzyonunu ve apoptozisini baskıladığını bildirmişlerdir.

Çalışmalar ferulik asidin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve DNA koruyucu etki gösterdiğini öne sürmüştür. Bunlara ek olarak, ferulik asitin, renal tubulointerstisyel fibrozisü inhibe ettiği ve Alzheimer hastalığının nörodejenerasyonu iyileştirdiğide

gözlenmiştir (Liu vd., 2019). Ayrıca, ferulik asit, kanser hücre döngüsünü değiştirmek, apoptozu indüklemek, hücre proliferasyonu ile ilgili proteinleri düzenleme olmak dahil bir çok yolla kanser proliferasyonunu inhibe edebilir (Cheng vd., 2020).

Fenolik bir bileşik olan tatarides'in akciğer kanseri adenokarsinom A-549 hücrelerine karşı önemli derecede sitotoksik etki ettiği gösterilmiştir (Zheng vd., 2012). Başka bir çalışmada ferulik asit (50-100 uM dozda) A549 hücrelerinin yaşama kabiliyetinde önemli derecede azalmıştır, 50-200 uM dozda ise süperoksit anyonun üretimini, A549 tümör hücrelerinin göçünü ve adezyonunu önemli derecede azaltmıştır (Bouzaiene vd., 2015).

Agunloye vd. (2018)'de, kafeik asit ve klorojenik asidin antioksidan özelliğini ve kardiyoprotective etkisini; siklosporin kaynaklı hipertansif sıçanlarda anjiyotensin dönüştürücü enzimi, kolinesteraz ve arjinaz aktivitelerinin mekanik rolünü araştırmışlardır. Sıçanlara siklosporin uygulamasının neden olduğu hipertansifi klorojenik asit ve kafeik asit normal düzeye gelmesini sağlamıştır. Bunun yanı sıra arjinaz aktivitesini önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır. Nitrit oksit biyoyararlanımını arttırmış, CAT aktivitesini yükseltmiştir. Çalışma sonucunda siklosporinin neden olduğu hipertansif kan basıncını düşürme özelliği göstermiş ve kardiyoprotective sağlamıştır (Agunloye vd., 2019).

Qiu vd. (2013)'de, insan mesane kanseri T24 hücrelerinde klonik metabolitler olan üronitler ve elajik asidin antiproliferatif ve antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Mesane kanser T24 hücrelerine elajik asit ile ürolitlerin uygulanmasında mRNA ekspresyonunu azalttığını tespit etmişlerdir. Kaspaz-3 aktivite edilip ilaca bağımlı apoptoz inhibe etmiştir. Ayrıca antioksidan kapasitesi olarak hücre içi ROS ve MDA seviyelerini düşürmüştür. Bunun sonucunda elajik ve onun metaboliti olan ürolitlerin kaspaz- 3 aktivite edilip ilaca bağlı hücre proliferasyonu inhibe edebileceğini ve mesane kanser T24 hücrelerin oksidatif stress durumunu azaltabileceğini söylemişlerdir (Qiu vd., 2013).

1.5. Çalışmanın Amacı

Çalışmamızda antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve bazı enzimlerin inhibitörü olarak hastalıkların tedavisinde önemli bir rolü bulunan Gallik asit ile kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan Doseksel ve Mitoksantron kemoterapi ilaçlarının kombinasyon etkileri çok yönlü olarak araştırılmıştır. Uygulama A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerinde yapılmıştır. Fenolik madde ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarının akciğer kanser hücre hattında en az konsantrasyon uygulanarak

iyileşme sağlayabilmek çalışmamız için önemlidir. Ayrıca seçilen kanser hücre hattında antioksidan enzim aktiviteleri (CAT, SOD, GST ve GR gibi) açısından olumlu değişimlerin gözlenmesi, CA enzim aktivitesi ile antikanser aktivite arasında bir bağlantının gözlenmesi durumunda antikanser aktivite ile birlikte bu aktiviteye etki edebilecek farklı etkilerde belirlenmiş olacaktır. Hücrelerden alınan proteinlerde esteraz yöntemi ile ölçülen karbonik anhidraz enzim aktivitelerinin kombinasyonların uygulandığı hücre hatlarında yükselmemesi, hücre hatları dışında kombinasyonların etken maddelere göre düşünüldüğünde istenilen antioksidan ve radikal giderme aktivite değişimleri ve yine kombinasyonların farklı dokularda görev yapan hCAI, hCAII ve hCAIX gibi enzimler üzerinde inhibitör etkisi göstermeleri durumları da çalışmada elde edilmesi istenilen sonuçlar arasındadır. Çalışma sonucunda antioksidan aktivite, antioksidan enzim aktiviteleri, CA aktivitesi ve kombinasyonların hücre üzerindeki antikanser etkisi gibi sonuçlar dikkate alındığında etkin ve düşük konsantrasyonlardaki sinerjik etkiye sahip kombinasyonlar elde edilmiş olacaktır. Literatürlerle desteklenilerek çalışmada elde edilen sonuçların etkileri çok yönlü olarak tartışılmıştır.

1.6. Çalışmanın Kapsamı

Çalışma kapsamı üç ana temel üzerine kuruludur. İlki hücre hattı üzerinde antikanser etkisini gözlemlemek amacıyla yapılan çalışmaları, ikincisi hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda antioksidan enzim aktiviteleri (CAT, SOD, GST, GR) ve CA aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaları sonuncusu ise hazırlanan Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonların hücre hattı dışında antioksidan aktivitelerini ve karbonik anhidraz enzimleri (CAI, CAII, CAIX) üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmaları kapsamaktadır. İnsan akciğer kanser (A549) hücre hattı üzerinde literatüre göre araştırılarak belirli konsantrasyon aralıklarında hazırlanan fenolik ve kemoterapik ajanların antikanser etkinin incelenmesinde, XTT [(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)] yöntemi ile hücre proliferasyonundaki değişimler belirlenmiştir. Hücre sayımı Thoma Lamıyla yapılmıştır ve inhibisyonlar Biotek-Epoch Cihazıyla ELİSA Yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Smith analizi olarak bilinen BCA yöntemi ile bir solüsyondaki (0.5 µg/mL-1.5 mg/mL) total protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Annexin-V FITC-PI kiti, hücrelerde meydana gelebilecek apoptotik ve nekrotik olayların belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Muse Annexin V Dead Cell Kit kullanılmıştır. Merck Millipore Muse Cell Analyzer cihazıyla apoptoz testi yapılmıştır. Hücre hattı üzerinde etkin sinerjik etkiyi gösteren Gallik asit

ve kemoterapi ilaçları konsantrasyonları CompuSyn programı kullanılarak belirlenmiştir.

Hücre hattında yapılan çalışmada antioksidan enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla katalaz (CAT), glutatyon s-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Yine hücre hattından alınan protein örneklerinde esteraz aktivitesi yöntemi ile CA enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Çalışmada Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinsayonların DPPH· giderme, ABTS·⁺ giderme, DMPD·⁺ giderme, Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme, Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme (FRAP) ve Cu²⁺-Cu¹⁺ indirgeme (Kuprak) metodları kullanılarak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Yine hazırlanan madde ve kombinasyonların CAI, CAII ve CAIX enzimleri üzerindeki etkileri ayrıca incelenmiştir.



2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$), Potasyum Persülfat ($K_2O_8S_2$), Muse Annexin V Apoptosis Detection Kit, hCAI, hCAII, hCAIX, Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Fosfat tampon (PBS), Destile Su, Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutatyon Redüktaz, Glutatyon S- Transferaz, Annexin V Dead Cell Kit, Dosetaksel, Mitoksantron, Cell Proliferation Kit II, N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED), Dimetil sülfoksit (DMSO), Tris(hydroxymethyl) aminomethane, Aseton ($CH_3)_2CO$, PNF, Formaldehit, $CuCl_2$, EDTA, Neokuprin, Triton X 100, Amonyum Asetat (CH_3COONH_4), Bovin Serum Albumin (BSA), Fetal Bovine Serum (FBS), XTT Cell Proliferation Assay Kit, Hidroklorik Asit (HCl), Sodyum Asetat (CH_3COONa), Demir(III) Klorür ($FeCl_3$), Disodyum Fosfat (Na_2HPO_4), Trikloroasetik Asit (TCA), 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), BHA, ABTS, DMPD, BHT, DPPH, α -tokoferol, Trolox, etil alkol.

2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Mikropipet, eldiven, mikropipet ucu, 96 plate okuyucu, soğutmalı santrifüj, protein kazıyıcı, falkon tüp, sıvı azot tankı ($-196\text{ }^{\circ}C$), su banyosu, $-80\text{ }^{\circ}C$ dondurucu, 25 cm^2 'lik flask, İnkübatör, ph metre, mikroskop, 75 cm^2 'lik flask, 96 kuyucuklu mikroplak, kabin, $+4\text{ }^{\circ}C$ soğutucu, spektrofotometre, hassas terazi, vorteks.

2.3. Kullanılan Hücre Hatları

A549 insan akciğer kanseri hücre hattı Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Tezin hücre kültürü bölümündeki deneysel çalışma aşamaları Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapılmıştır.

2.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.1.1. Fenolik Bileşiklerin, Kemoterapi İlaçlarının ve Bu Bileşiklerin Uygun Kombinasyonlarının Hazırlanması

Antioksidan metotlarla ilgili yapılan çalışmalarda yalnızca ABTS $\cdot$ radikali giderme metodunda Gallik asidin konsantrasyonu 1:8 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı. Bunun dışında bütün metotlarda Gallik asit, kemoterapi ilaçları 1:1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanarak kullanıldı. Çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı.

2.4.1.2. DPPH $\cdot$ Giderme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler

1 mM'lık DPPH $\cdot$ çözeltisi 39 mg DPPH $\cdot$ tamamen çözününene kadar 100 mL etanolde karıştırılarak hazırlandı.

2.4.1.3. ABTS $\cdot^+$ Giderme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler

Çalışma için gerekli olan 2 mM'lık ABTS çözeltisi için 11 mg ABTS 0.1M'lık (pH 7.4) fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı. 2.45 mM'lık persülfat ($K_2O_8S_2$) çözeltisi için 66.25 mg $K_2O_8S_2$ 0.1M'lık fosfat tamponu (pH 7.4) eklenerek oluşturdu. Toplam hacim saf su ile 100 mL tamamlandı.

2.4.1.4. DMPD $\cdot^+$ Giderme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler

0.1 M'lık asetat tamponu (pH 5.25) için 2.04 g CH_3COON bir miktar distile suda çözüldü ve pH'sı 5.25'e ayarlandı. Son hacmi saf su ile 250 mL'ye balonjojede tamamlanarak hazırlandı. 0.1 M'lık 10 mL DMPD çözeltisi hazırlandı. 1 mM'lık DMPD $\cdot^+$ çözeltisi 0.1 M'lık DMPD çözeltisinden 1 mL hacim alınarak 0.1 M'lık ve 100 mL'lik (pH 5.25) asetat tamponuna aktarıldı ve üzerine 0.05 M'lık 0.2 mL $FeCl_3$ ilave edilerek hazırlandı. 0.05 M'lık 100 mL $FeCl_3$ çözeltisi saf suda çözülerek hazırlandı.

2.4.1.5. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler

0.2 M'lık fosfat tamponu (pH 6.6) için 6.25 g Na_2HPO_4 bir miktar saf suda çözüldü ve pH değeri 6.6'ya ayarlandı. Son hacimi destile su ile 200 mL olacak şekilde tamamlanarak hazırlandı. % 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi 1.51 g $K_3Fe(CN)_6$ alınarak bir miktar saf suda çözülmesi sağlanarak ve toplam hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. % 10'luk TCA çözeltisi bir miktar saf suda çözülerek ve toplam hacmi destile su ile 150 mL olacak şekilde tamamlanarak hazırlandı. % 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi bir miktar distile suda çözülerek ve toplam son hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

2.4.1.6. Fe³⁺-Fe²⁺ (FRAP) İndirgeme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler

0.3 M'lık pH 3.6 olan sodyum asetat tamponu: 40 mM'lık % 37'lik 100 mL HCl çözeltisi için 0.335 mL alınarak son hacim distile su ile 100 mL hacime tamamlandı. 10 mM'lık TPTZ çözeltisi için 0.312 g TPTZ (Trispyridyltriazin) tartılarak % 37'lik 100 mL HCl içerisinde çözünerek hazırlandı. 20 mM'lık FeCl₃ çözeltisi için 0.54 g FeCl₃.6H₂O alındı ve 100 mL hacime saf suda çözülerek hazırlandı. FRAP reaktifi için 10 hacim NaCH₃COO tamponu, 1 hacim FeCl₃.6H₂O çözeltisi ve 1 hacim TPTZ çözeltisi karıştırılarak hazırlandı.

2.4.1.7. Cu²⁺-Cu⁺¹ İndirgeme Metodu İçin Hazırlanan Çözeltiler

0.01 M'lık 50 mL CuCl₂ çözeltisi için 47 mg CuCl₂ alındı ve 50 mL destile suda çözülerek hazırlandı. 7.5 mM'lık 50 mL etanolik neokuprin çözeltisi için 78 mg Neokuprin alındı ve 50 mL etanolde çözülerek hazırlandı. 1 M'lık 100 mL CH₃COONH₄ tamponu (pH: 6.5) için 7.8 g CH₃COONH₄ alındı ve bir miktar saf suda çözülerek pH'sı 6.5'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL hacime tamamlanarak hazırlandı.

2.4.2. Fenolik Maddelerin ve Kemoterapi İlaçlarının Hazırlanması

2.4.2.1. Gallik asit

1 mg Gallik asit tartıldı. 1 mL DMSO'da çözüldü ve üzerine 1 mL PBS çözeltisi eklenerek son hacmi 2 mL'ye tamamlandı. 250 µM'lık ana stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu ana stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlar (25-150 µM) hazırlandı.

2.4.2.2. Mitoksantron

1 mg Mitoksantron tartıldı. 50 µL DMSO'da çözüldü ve son hacim 1 mL'ye besiyeri ile tamamlandı. 250 µM'lık ana stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu ana stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlar (0.0125-5 µM) hazırlandı.

2.4.2.3. Dosetaksel

1 mg Dosetaksel tartıldı. 50 µL DMSO'da çözüldü ve son hacmi 1 mL'ye besiyeri ile tamamlandı. 250 µM'lık ana stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu ana stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlar (5-200 µM) hazırlandı.

2.4.2.4. Fenolik Madde ve Kemoterapi İlaç Kombinasyonunun Hazırlanması

Gallik asit (GA) ve Mitoksantronun (MIX) A549 hücre hattı üzerinde belirlenen konsantrasyonlarda (GA:25 + MIX: 0.1, GA:25 + MIX: 0.5, GA:25 + MIX: 1, GA:25 + MIX: 5) kombinasyonları hazırlandı.

Gallik asit (GA) ve Mitoksantronun (MIX) A549 hücre hattı üzerinde belirlenen konsantrasyonlarda (GA:50 + MIX: 0.1, GA:50 + MIX: 0.5, GA:50 + MIX: 1, GA:50 + MIX: 5) kombinasyonları hazırlandı.

Gallik asit (GA) ve Dosetakselin (DOC) A549 hücre hattı üzerinde belirlenen konsantrasyonlarda (GA:25 + DOC: 5, GA:25 + DOC: 10, GA:25 + DOC: 25, GA:25 + DOC: 50) kombinasyonları hazırlandı.

Gallik asit (GA) ve Dosetakselin (DOC) A549 hücre hattı üzerinde belirlenen konsantrasyonlarda (GA:50 + DOC: 5, GA:50 + DOC: 10, GA:50 + DOC: 25, GA:50 + DOC: 50) kombinasyonları hazırlandı.

2.4.3. Hücre Proliferasyon Testi (XTT) İçin Çözelti Hazırlanması

XTT solüsyonu için, 5 mL XTT içerisine 100 µL aktivatör eklenerek hazırlandı.

2.4.4. Bisinkoninik Asit (BCA) Testi İçin Çözeltilerin Hazırlanması

2 mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA) solüsyonlarından seri seyreltme ile diğer standartlar (0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 2 mg/mL (w/v) ve boş solüsyon) hazırlandı. Reaktif A ve Reaktif B, 1:100 oranında karıştırıldı. Standartlar ve numuneler 100 µL WR ile karıştırıldı ve karanlıkta 37 °C'de 1 saat su banyosunda bekletildi.

2.4.5. Apoptoz Testinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

250 µL'lik hacimde ana stok çözeltisi hazırlandı. Mitoksantronun hazırlanan bu ana stok çözeltisinden farklı konsantrasyonları (0.0125-5 µM) aralıkları hazırlandı.

2.4.6. Antioksidan Enzim Aktivitesi Metodu İçin Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.6.1. Katalaz (CAT) Enzimi

2 mL CAT test tamponu 18 mL'lik ultra saf su ile seyreltildi. Bu test tamponu (100 mM potasyum fosfat, pH 7.0) testte kullanıldı. 5 mL CAT örnek tamponu 45 mL'lik distile su ile seyreltildi. Bu son örnek tamponu (25 mM potasyum fosfat, pH 7.5, 1 mM EDTA ve % 0.1 BSA), formaldehit standartlarını seyreltmek için kullanıldı. Liyofilize sığır karaciğeri CAT tozu 2 mL seyreltilmiş örnek tamponu ekleyerek CAT

(Kontrol) hazırlandı. Hazırlanmış 100 µL enzim alındı ve 1.9 mL seyreltilmiş numune tamponu ile seyreltildi. 40 µL CAT hidrojen peroksiti, 9.96 mL'lik ultra saf su ile seyreltildi.

2.4.6.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi

2 mL numune tampon konsantresi 18 mL'lik HPLC ultra saf su ile seyreltildi. 3 mL test tampon konsantresi 27 mL'lik ultrasaf su ile seyreltildi. Ksantin Oksidaz, 50 µL'si başka bir cam şişeye aktarıldı ve 1.95 mL numune tamponu ile seyreltildi. Radikal Dedektör, 50 µL'si başka bir cam şişeye aktarıldı ve 19.95 mL'lik seyreltilmiş test tamponu ile seyreltildi.

2.4.6.3. Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzimi

10 mL GST analiz tampon konsantresi 10 mL'lik ultra saf su ile seyreltildi. 5 mL GST analiz tampon konsantresi 5 mL'lik ultra saf su ile seyreltildi. At karaciğeri GST'nin liyofilize toz içerik ilk önce enzimi 0.5 mL ultra saf su ile sulandırıldı. CDNB, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen solüsyonu hazırlandı.

2.4.6.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzimi

GSH MES Buffer (2X), Tampon 0.4 M 2-(N-morfolino)etansülfonik asit, pH (6.0), 0.1 M fosfat ve 2 mM EDTA'dan oluşmaktadır. Kullanımdan önce 60 mL tampon 60 mL'lik ultra saf su ile seyreltildi. GSH Co-Factor Mixture, içerik 0.5 mL su ile sulandırıldı. GSH Enzyme Mixture, 0.2 mL tampon içinde glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve GR içeriğe sahip çalkalanır ve içine 2 mL seyreltilmiş MES tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. GSH DTNB tozu, 0.5 mL su ile sulandırıldı ve iyice karıştırıldı.

2.4.7. Karbonik Anhidraz (CAI, II ve IX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

0.05 M Tris-SO₄, pH (7.4) (Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon) çözeltisi için 6.054 g Tris 950 mL ultrasaf su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH (7.4)'e getirildikten sonra hacim saf su ile son hacim 1 litreye tamamlandı.

3 mM 4-Nitrofenil asetat (PNF) (Esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat) çözeltisi için yaklaşık 0.027 g PNF tartılır ve yaklaşık 1mL asetonda çözülür. Yavaş bir şekilde 49 mL saf su içine ilave edilerek çözülmesi sağlanır. Günlük olarak hazırlanır.

2.5. Hücre Kültürü Uygulamaları

2.5.1. Hücre Hattı ve Kültürü

Akciğer kanseri hücre hattı (A549) Dulbecco's Modified Eagle Media ve Leibovitzs ortamında kültüre edildi. Daha sonra hücre kültürlerinin inkübasyonu % 5 CO₂ , % 95 nem 37 °C'de inkübatörde gerçekleştirildi. Bu çalışmalar Class II Kabininde yapıldı.

2.5.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

-80 °C'de yada sıvı azot içerisinde muhafaza edilen hücreler 37 °C'deki su banyosunda ısıtıldı. Daha sonra T-75 flask üzerine hangi besiyeri kullanıldığını, hücrenin adını, işlemi yapan kişinin adı, pasaj numarasını ve işlemin yapıldığı tarih yazıldı. Daha sonra T-75 flask içerisine 8 mL besiyerini tek kullanımlık pipet yardımıyla aktarıldı. Hücrenin içerisinde bulunduğu tüpte pipet yardımıyla çek bırak işlemi yapılarak hücrenin karışımı sağlandı. Daha sonra hücreyi pipet yardımıyla alarak T-75 flask içerisine aktarımı sağlandı. T-75 flask içerisine aktarımı sağlanan hücrenin besiyerinde homojen dağılımını sağlamak amacıyla hafif bir şekilde çalkalama işlemi yapıldı. Hücrenin besiyerine homojen bir şekilde dağılıp dağılmadığını gözlemlemek amacıyla mikroskopta kontrol edildi. En son işlem olarak T-75 flask içerisine aktarılan hücreler % 5 CO₂ nem 37 °C'de inkübatör içerisinde 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda T-75 flask içerisindeki besiyerini DMSO'dan uzaklaştırmak amacıyla yeni besiyeri ile değiştirildi.

2.5.3. Besiyeri Değişimi

Hücrenin ve besiyerinin bulunduğu T-75 flask içerisinde mevcut besiyerini flask'ın yan tarafından hücrelere zarar vermeden çekildi. Mevcut besiyerini çektikten sonra 5 mL fosfat tamponu (PBS) ile yıkama işlemi yapmak için flask'ın yan yüzeyden olacak şekilde aktarıldı. Fosfat tamponun tam karışması sağlandı ve fosfat tamponu flask içerisinden alınarak atıldı. Son olarakda 8 mL besiyeri flask'ın içerisine eklenerek besiyeri değiştirme işlemi gerçekleştirildi.

2.5.4. Hücrelerin Pasajlanması

Besiyerinin ve hücrelerin bulunduğu T-75 flask içerisinden besiyeri pipet yardımıyla boşaltıldı. Daha sonra T-75 flask içerisine 5 mL fosfat tamponu (PBS) ile yıkama yapıldı ve fosfat tamponu boşaltıldı. Daha sonra hücreleri kaldırmak için 3 mL

Trypsin eklenerek T-75 flask 5-10 dakika inkübe edildi. İnkübe sonunda alınan T-75 flaskın tabanına hücrelerin kalkması için hafifçe vuruldu. Daha sonra 3 mL besiyeri eklenerek pipet yardımıyla 2-3 kez karıştırıldı. Daha sonra 15 mL'lik falkon tüpüne pipet yardımıyla çekilerek aktarıldı ve 800 rpm de yaklaşık 5 dakika santrüfüjleme işlemi yapıldı. Santrüfüjlemeden sonra üste kalan sıvı kısım atıldı. Daha sonra kaç adet pasajlama yapılacaksa o kadar mL besiyeri eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 1 mL alınarak flaslara pasajlandı. Son olarak pasajlanan hücre kültürleri kültürleri 37 °C'de, % 5 CO₂ , % 95 nem içeren inkübatör içerisinde inkübe edildi.

2.5.5. Hücrelerin Sayımı

Büyüme mediumunda homojen olarak çözünen hücrelerden sayım için 100 µL alındı, 2mL'lik ependorf tüplerine aktarıldı. İçerisine tripan blue boyasından 100 µL eklendi ve karışmasını sağlandı. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Homejenize edilen süspansiyondan 10 µL alındı sayım için Hemocytometer sayım yöntemini kullanıldı. Inverted mikroskop ile canlı hücre sayımını saptamak amacıyla canlı ve cansız hücreleri birbirinden ayırt ederek hücre sayımını yapıldı. Mikroskop altında canlı hücreler boyayı absorbe etmeyerek parlak olarak görülüp, cansız hücreler boyayı absorbe ederek mavi renkte gözlemlendi. Hücre sayımı sonrasında, iki odacık ortalaması alındı ve mL başına düşen hücre sayısı hesaplanması;

Hücre sayısı/mL = iki odacık ortalama hücre sayısı x DF(dilüsyon faktör) x 10⁴

2.5.6. Hücrelerin Dondurulması

Hücreleri dondurmaya hazırlamak için her cryotüp üzerine adı, kullanılacak pasaj numarası ve tarihi yazıldı. İlk olarak T-75 flask içerisindeki ortam tahliye edildi. T-75 flask içerisine 5 mL fosfat tamponu (PBS) ile yıkama yapıldı. Daha sonra T-75 flask içerisindeki yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreleri kaldırmak için T-75 flask içerisine 3 mL Trypsin eklenerek kaldırma işlemi yapıldı. Sonrasında flask 5-10 dakika 37 °C'de CO₂'de inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra flask içerisine 3 mL besiyeri eklendi ve pipet yardımıyla 15 mL'lik falkon tüpüne aktarımı sağlandı. 800 rpm de yaklaşık 5 dakika santrüfüj edildi. Santrüfüj edildikten sonra pellete zarar vermeden süpernant tahliye edildi. Pellete 5 mL frozen medium (% 10'luk DMSO, Gliserol) eklendi ve çözünmesi sağlandı. Süspanse edilen hücreler cryotüplere akatarılarak vakit kaybetmeksizin -80 °C'deki dondurucuya kaldırıldı. Yaklaşık bir hafta sonra, uzun süreli depolama amacıyla cryotüplerin yaklaşık -196 °C'deki sıvı azot tankına aktarımı yapıldı.

2.6. İnsan Akciğer Adenokarsinoma (A549) Kanser Hücre Hatları Üzerinde Fenolik ve Kemoterapik Ajanların Antikanser Etkinin İncelenmesi

2.6.1 Hücre Proliferasyonu Testi (XTT Testi)

XTT [(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)] yöntemi ile hücre proliferasyonundaki değişimler belirlendi. XTT analizi, XTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin ya da formazan boyalarının kolorimetrik ölçüm metoduna dayanan hücre çoğalma miktarının analiz edildiği bir yöntemdir. Söz konusu yöntemde, proliferasyonu artmış hücreler tarafından XTT tuzu kullanılmaktadır ve artan dehidrojenaz enzim aktivitesine bağlı olarak XTT tuzunu turuncu renkli suda çözünebilen formazan ürününe dönüştürüldü. Elde edilen renk değişimi, ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülerek hücre proliferasyonundaki değişimler belirlendi.

Cell Proliferation Kit II (XTT) kullanılmıştır.

Hücre sayımı Thoma Lamiyla yapıldı ve İnhibisyonlar Biotek-Epoch Cihazıyla ELİSA Yöntemiyle gerçekleştirildi.

Gallik asit ile Dosetaksel ve Mitoksantronun farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarının A549 insan akciğer kanser hücre hattı üzerindeki kombinasyon indeks değerleri (CI)'sı ve sinerjik etkilerini belirlemek amacıyla CompuSyn programı kullanıldı.

2.6.2. CompuSyn Programı

İlaç kombinasyon denemelerinde ilaçların birbiriyle sinerjik yada antagonistlik etkilerini belirlemek amacıyla kullanılan programdır. Program kitlesel eylem yasası ilkesinden türetilerek medyan etki denklemine dayanır. Bu denklem Henderson-Hasselbalch, Hiil, Scatchard ve Michalis-Menten denklemlerini kapsar. Program içerisindeki CI (kombinasyon indeksi) üç seviyeyi gösterir. Bu üç seviyedeki CI değerleri; $CI > 1$ ilaçların antagonistlik etkisini, $CI = 1$ ilaçların aditiflik etkisini ve $CI < 1$ ise ilaçların sinerjistik etkisini gösterir. İlaç kombinasyonunda çalışılırken her ilacın kombine yada tek başına kuvvet değeri (D_m değeri) yada doz etki eğrisini (m değeri) hesaba katar (Chou, 2010).

Farklı konsantrasyonlardaki Gallik asidin, Mitoksantron ve Dosetaksel ile kombinasyonunda insan akciğer kanseri hücre (A549) hattı üzerinde sinerjik etkilerinin belirlenmesi amacıyla CompuSyn programı kullanıldı ve CI değerleri hesaplandı.

2.6.3. BCA (Bisinkoninik Asit) Protein Tayini

BCA, Smith analizi olarak da bilinir. Bir solüsyondaki (0.5 µg/mL-1.5 mg/mL) total protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılır. BCA temelinde iki tepkimeye göre analiz eder. Birincisi, proteindeki peptit bağlarının Cu^{+2} iyonlarını Cu^{+1} iyonuna indirgemesidir. Cu^{+2} solüsyondaki protein sayısı ile paralel olarak indirgenir. İkinci adımda, bisinkoninik asidin 2 molekülü ile Cu^{+1} iyonu birleşerek 562 nm dalgaboyunda ışığı güçlü bir şekilde soğuran mor renkli kompleks oluşturur (Olson ve Markwell, 2007).

2.6.4. Apoptoz Testi

Annexin-V FITC-PI kiti, hücrelerde meydana gelebilecek apoptotik ve nekrotik olayların belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Hücrede apoptoza bağlı hücre zarının dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine annexin V boyası bağlanarak apoptotik hücreleri görünür hale getirirler. Annexin V boyasının nekrotik hücrelerde bağlanma olasılığı bulunduğu söz konusu hücrelerin ayırt edilebilmesi için ikinci boya olarak propidyum iyodür kullanıldı. Sadece sızdıran nekrotik hücrelerin DNA'sını boyayan ve apoptotik ve nekrotik hücreler arasında bir ayırım yapmayı propidyum iyodür (PI) boyası sağlar. Kite belirtilen talimatlar doğrultusunda hücreler Annexin V ve PI boya ile boyanacak ve flow (akım) sitometresi ile hücrelerin hangi oranda apoptoza ve nekroza gittiği tespit edildi.

Muse Annexin V Dead Cell Kit kullanılmıştır. Merck Millipore Muse Cell Analyzer cihazıyla apoptoz testi yapıldı.

2.6.5. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.6.5.1. Katalaz (CAT) Enzimi Aktivite Ölçüm

Plaka üzerinde belirtilen kuyucuklara standart için A-G kuyucuklarına 100 µL seyreltme deney tamponu, 30 µL metanol ve 20 µL standart eklendi. Pozitif kontrol kuyucukları içinse iki kuyuya 100 µL seyreltme deney tamponu, 30 µL metanol ve 20 µL seyreltilmiş CAT eklendi. Örnek kuyucukları için, iki kuyuya 100 µL seyreltme deney tamponu, 30 µL metanol ve 20 µL örnek eklendi. Kullanılan tüm kuyucuklara 20 µL seyreltilmiş hidrone peroksit ekleyerek reaksiyon başlatıldı. Plaka kapağı kapatılıp çalkalandı ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Reaksiyon sonlandırmak için 30 µL potasyum hidroksit eklendi ardından her kuyucuğa 30 µL CAT eklendi. Plaka kapağı kapatılıp oda sıcaklığın 10 dakika inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 10 µL CAT

potasyum periodat eklendi ve plaka çalkalanarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Plaka okuyucusu ile 540 nm de absorbans okundu.

2.6.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Aktivite Ölçümü

Plaka üzerinde belirtilen kuyucuklara SOD standart için 200 µL seyreltilmiş radikal dedektörü, 10 µL standart eklendi. Örnek kuyucukları için, 200 µL seyreltilmiş radikal dedektörü, 10 µL örnek eklendi. Kullandığımız tüm kuyucuklara 20 µL ksantin oksidaz ekleyerek reaksiyon başlatıldı. 96 kuyulu plaka birkaç saniye sallanarak karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. 440-460 nm de absorbans okundu.

2.6.5.3. Glutasyon S-transferaz (GST) Enzimi Aktivite Ölçümü

Üç kuyucuğa 170 µL okuma tamponu ve 20 µL glutasyon eklendi. Pozitif kontrol kuyucukları içinse üç kuyuya 150 µL okuma tamponu, 20 µL glutasyon ve 20 µL seyreltilmiş GST (kontrol) eklendi. Örnek kuyucukları için üç kuyucuğa, 150 µL okuma tamponu, 20 µL glutasyon ve 20 µL örnek eklendi. Kullandığımız tüm kuyucuklara 10 µL CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) mümkün oldukça hızlı bir şekilde ekleyerek reaksiyon başlatıldı. 340 nm'de her dakika birkez toplamda en az beş kez okuma yapılarak absorbans alındı.

2.6.5.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzimi Aktivite Ölçümü

GR enzim aktivitesini belirlemek amacıyla Cayman'ın Glutasyon Assay Kit'i kullanıldı. Glutasyonun sülfhidril grubu, DTNB ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonucu sarı renkli bir TNB üretir. Reaksiyonda üretilen karışık disülfid GSTNB, GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek amacıyla GR tarafından indirgenir. TNB üretim hızı, bu geri dönüşümle orantılıdır ve numunedeki GSH konsantrasyonu ile orantılıdır. Oluşan renkli kompleksin 405-414 nm'de absorbansının ölçümü, numunede doğru bir GSH tahmini sağlar.

GR enzim aktivitesi ölçümünde öncelikle plakadaki belirlenmiş kuyulara kuyu başına 50 µL standart eklendi. Numune kuyularının her birine de 50 µL numune eklendi ve plaka kapağı ile kapatıldı. 20 mL'lik bir şişede, MES tamponu (yaklaşık 11.25 mL), yeniden oluşturulmuş kofaktör karışımı (0.45 mL), su (2.3 mL), yeniden oluşturulmuş enzim karışımı (2.1 mL) ve yeniden oluşturulmuş DTNB (0.45 mL) karıştırılarak test karışımı hazırlandı. Standartları ve örnekleri içeren kuyucukların her birine 150 µL hazırlanmış test karışımından eklendi. Plaka kapağını değiştirilerek kapatıldı.

Numunelerin GSH konsantrasyonu kinetik yöntemle 30 dakika boyunca beş dakikalık aralıklarla 410 nm’de ölçülerek belirlendi.

Her bir standart ve numune için ortalama absorbans değerleri bulundu. Bulunan ortalamaların zamana karşı grafiği çizildi ve eğimi belirlendi. Bu eğime i-slope adı verilir. GSH’ın bir fonksiyonu olarak her bir standartın i-slope değerlerine karşılık bir grafik çizildi ve eğimi belirlendi. Bu eğime ise f-slope adı verilir. Eğime karşı GSH standar eğrisi kullanılarak ilgili eğimlerinden her numune için toplam GSH değerleri hesaplandı.

2.6.6. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Hücre hatlarından alınan proteinlerde CA enzim aktivitesini belirlemek amacıyla esterase aktivitesi yöntemi kullanıldı (Öztürk Sarıkaya ve Gülçin 2010). Ölçümün esası CA enziminin substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorpsiyon veren p-nitrofenolata veya p-nitrofenole hidroliz etmesine dayanmaktadır. Ölçüm 400 µL Tris tamponu, 220 µL su, 360 µL PNF ve 20 µL enzim kullanılarak toplam hacim 1mL olacak şekilde spektrofotometrede 348 nm’de 3 dakika boyunca yapıldı. 0. Dakika ve 3. Dakikada elde edilen sonuçlar hesaplama için kullanıldı. İnhibitör kullanıldığında tampondan azaltılarak toplam hacim 1 mL olacak şekilde ölçümler tekrarlandı.

2.7. Antioksidan Aktivitesi Tayin Metodları

ABTS radikali giderme aktivitesi için yapılan çalışmada yalnızca Gallik asidin konsantrasyonu 1:8 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek kullanılmış bunun dışında bütün metotlarda Gallik asit, kemoterapi ilaçları 1:1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanarak kullanıldı. Çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı.

2.7.1. DPPH • Giderme Metodu

DPPH radikalinin 1 mM konsantrasyonluk çözeltisi serbest radikal olarak kullanıldı. Numune olarak hazırlanan 1mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden etanol ile 3 mL hacimde ara çözeltiler (1, 3, 5, 7, 9 ve 11 µg/mL) hazırlandı. Sonrasında her bir konsantrasyondaki tüplere stok DPPH• çözeltisinden yaklaşık 1 mL ilave edilerek karanlıkta oda sıcaklığında yarım saat inkübe edildi. Kör olarak etanole, kontrol olarak 3 mL etanol ve 1 mL DPPH• çözeltisi 517 nm’de absorbans ölçüldü. Azalan absorbans geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi (Blois, 1958).

2.7.2 ABTS•⁺ Giderme Metodu

Çalışma için gerekli 7 mM'lık konsantrasyonda hazırlanan ABTS stok çözeltisi üzerine 2.45 mM'lık persülfat ($K_2O_8S_2$) çözeltisi, fosfat tamponu (pH 7.4, 0.1 M) eklenerek oluşturuldu. ABTS radikal giderme aktivitesi 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda çalışıldı. Bu konsantrasyonlarda da hazırlanan tüplerimizin içerisine 1 mL ABTS•⁺ radikal çözeltisi ilave edildikten sonra yaklaşık yarım saat inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak kullanılacak çözeltinin absorbansı 734 nm'de yaklaşık 0.8 civarlarına geldikten sonra numuneler ve standartlar pipetlenmeye başlanacaktır. Farklı konsantrasyonlarda tüplere ilave edilen numunelere ABTS stok çözeltisi ilave edilerek yaklaşık 30 dakika sonunda absorbansları 734 nm'de ölçüldü (Re vd., 1999).

2.7.3. DMPD•⁺ Giderme Metodu

100 mM 100 mL'lik DMPD çözeltisinin (0.05 M, pH 5.3) olacak şekilde 0.2 mL FeCl_3 ilavesiyle renkli radikal kation ($\text{DMPD}^{\bullet+}$) elde edildi. Bu çözeltinin 1 mL'si için tapmon çözeltiden oluşan köre karşı 505 nm'de ölçüm yapıldı. Farklı konsantrasyonlardaki numune çözeltileri (1, 3, 5, 7, 9, ve 11 $\mu\text{g/mL}$) deney tüplerine aktarıldı ve hacim saf suyla 0.5 mL olacak şekilde tamamlandı. Bunun üzerine 1 mL $\text{DMPD}^{\bullet+}$ çözeltisi eklendi. Yaklaşık 50 dakikalık bir inkübasyondan sonra absorbans değerleri tapmon çözeltiden oluşan köre karşı 505 nm'de ölçüldü. N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür radikali giderme aktivitesi tayini Fogliona ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (Foglano vd., 1999).

2.7.4. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Metodu

Öncelikle 1mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda olacak ara stoklar hazırlandı. Sonrasında her bir tüpe 0.2 M'lık 2.5 mL fosfat tamponu (pH 6.6) ve % 1'lik 2.5 mL potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) ilave edilerek karışım 50 °C'de 20 dk inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına % 10'luk 2.5 mL triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2.5 mL alındıktan sonra bunun üzerine 2.5 mL destile su ve % 0.1'lik 0.5 mL FeCl_3 ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de destile sudan oluşan köre karşı okundu. Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metoduna göre belirlendi (Oyauzu, 1986).

2.7.5. Fe³⁺-Fe²⁺ (FRAP) İndirgeme Metodu

FRAP indirgeme kapasitesi, demir çözünürlüğünü korumak amacıyla asidik pH 3.6'da gerçekleştirilen, [Fe³⁺-(TPTZ)₂]³⁺ kompleksinin [Fe²⁺-(TPTZ)₂]²⁺ye dönüşümü sağlandığı bir yöntemdir. Standartlara veya numune ekstraktlarına sırası ile FeCl₃ (20 mM) çözeltisi ve hazırlanmış olan FRAP reaktifi eklenerek 593 nmde absorbansları ölçüldü (Gülçin 2012).

2.7.6. Cu²⁺-Cu⁺İndirgeme Kapasitesi

Tüplere 0.01 M'lık 25 mL CuCl₂ çözeltisi, 7.5 mM'lık 0.25 mL etanolik neokuprin çözeltisi ve 1 M'lık 0.25 mL CH₃COONH₄ tampon çözeltisi sırasıyla eklendi. Yarım saat sonra 450 nm'de destile sudan oluşan köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Cu²⁺ indirgeme aktivitesi Apak vd. (2006)'da yapmış olduğu bakır iyonları indirgeme yönteminin küçük bir değimi ile belirlendi (Apak vd., 2006).

2.7.7. In Vitro Antioksidan Çalışmalarında Etkin Kombinasyon Değerinin Belirlenmesi

In vitro antioksidan çalışmalarında etkin kombinasyon değerlerini belirlemek amacıyla CompuSyn programı kullanıldı. Antioksidan metotlarda her yöntem kendi içinde 1'den yüksek çıkan değer varsa en büyük değer 0.999 olarak alınarak orantı yoluyla tüm değerler yeniden düzenlendi. Bu değerlerin programa uygulanmasıyla CI değeri 1'in altında olanlar sinerjik etki gösteren değerler olarak belirlendi.

2.8. Karbonik Anhidraz (hCAI, hCAII ve hCAIX) Aktivitesi

Fenolik madde ve kemoterapik ilaç kombinasyonların CAI, II ve IX enzimleri üzerindeki etkilerini inceleyebilmek amacıyla esteraz aktivitesi yöntemi kullanıldı (Öztürk Sarıkaya ve Gülçin 2010). Ölçümün esası CA enziminin substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenolata veya p-nitrofenole hidroliz etmesine dayanmaktadır. Ölçüm 400 µL Tris tamponu, 220 µL su, 360 µL PNF ve 20 µL enzim kullanılarak toplam hacim 1 mL olacak şekilde spektrofotometrede 348 nm'de yapıldı. İnhibitör kullanıldığında tampondan azaltılarak toplam hacim 1 ml olacak şekilde ölçümler tekrarlandı.

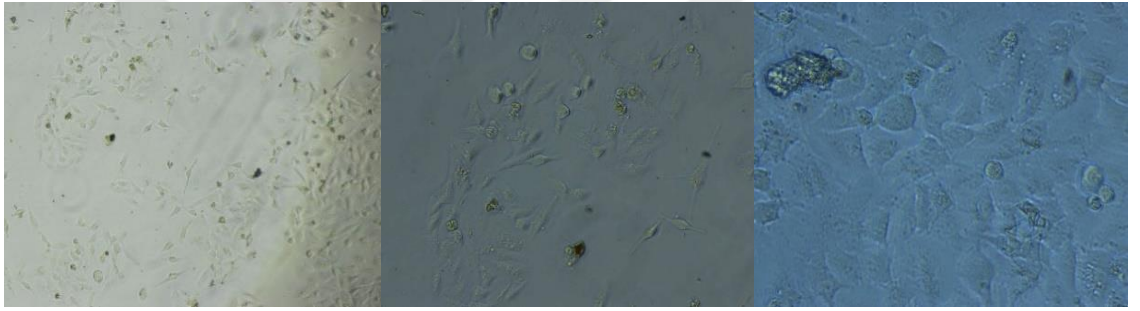
3. BULGULAR

3.1. İnsan Akciğer Adenokarsinoma (A549) Kanser Hücre Hatları Üzerinde Fenolik ve Kemoterapik Ajanların Antikanser Etkisi

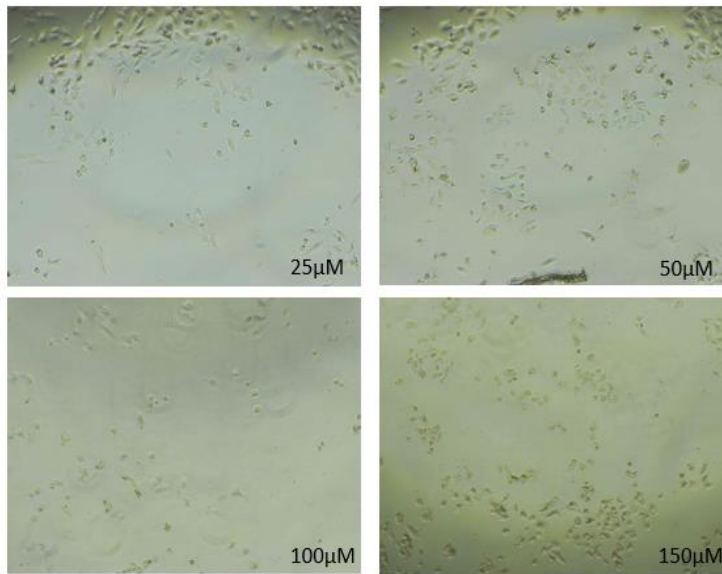
3.1.1. Hücre Proliferasyonu Testi (XTT Testi) Değerlendirilmesi

Gallik asit, Mitoksantron ve Dosetakselin ve kombinasyonlarının belirlenen konsantrasyonlarında inhibisyon değerleri ve mikroskop görüntüleri tablolar ve şekiller halinde verildi.

Faz kontrast mikroskobu altında hücre canlılıkları kontrol edildi. Şekil 5'te A549 hücre hatları gösterildi ve Şekil 6'da Gallik asidin farklı konsantrasyonlarındaki hücre hatları gösterildi.



Şekil 5. A549 hücre hatlarının faz kontrast mikroskobunda sırasıyla farklı büyütmelerdeki (10x, 20x ve 40x) görüntüleri



Şekil 6. Gallik asidin 25µM-150µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskobunda 10x büyütmedeki görüntüleri

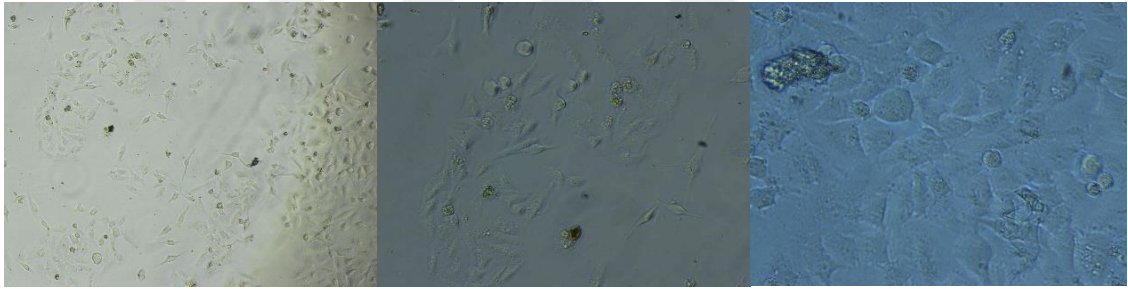
Faz kontrast mikroskobu altında hücre hatları gözlemlendi. 10x büyütmede farklı konsantrasyonlarda canlı hücreler gözlemlendi.

A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asidin inhibisyon değerleri (%) Tablo 1’de verildi.

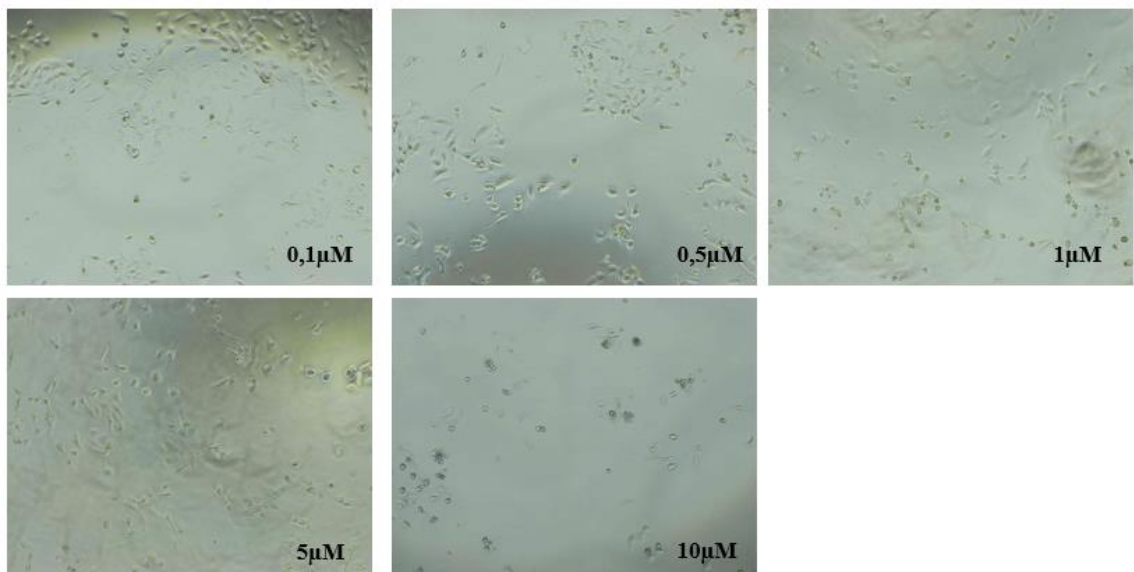
Tablo 1. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asidin % inhibisyon değerleri

Gallik asit konsantrasyonu (μM)	% İnhibisyon
25	55.07
50	57.89
100	64.41
150	88.57

Faz kontrast mikroskobu altında hücre canlılıkları kontrol edildi. Şekil 7’de A549 hücre hatları gösterildi ve Şekil 8’de Mitoksantronun farklı konsantrasyonların daki hücre hatları gösterildi.



Şekil 7. A549 hücre hatlarının faz kontrast mikroskobunda sırasıyla farklı büyütmelerdeki (10x, 20x ve 40x) görüntüleri



Şekil 8. Mitoksantronun 0.1 μM -10 μM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskobunda 10x büyütmedeki görüntüleri

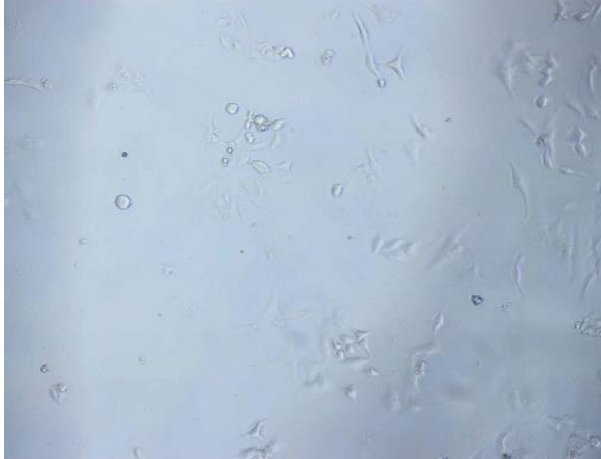
Faz kontrast mikroskobu altında hücre hatları gözlemlendi. 10x büyütmede farklı konsantrasyonlarda canlı hücreler gözlemlendi.

A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Mitoksantronun inhibisyon değerleri (%) Tablo 2’de verildi.

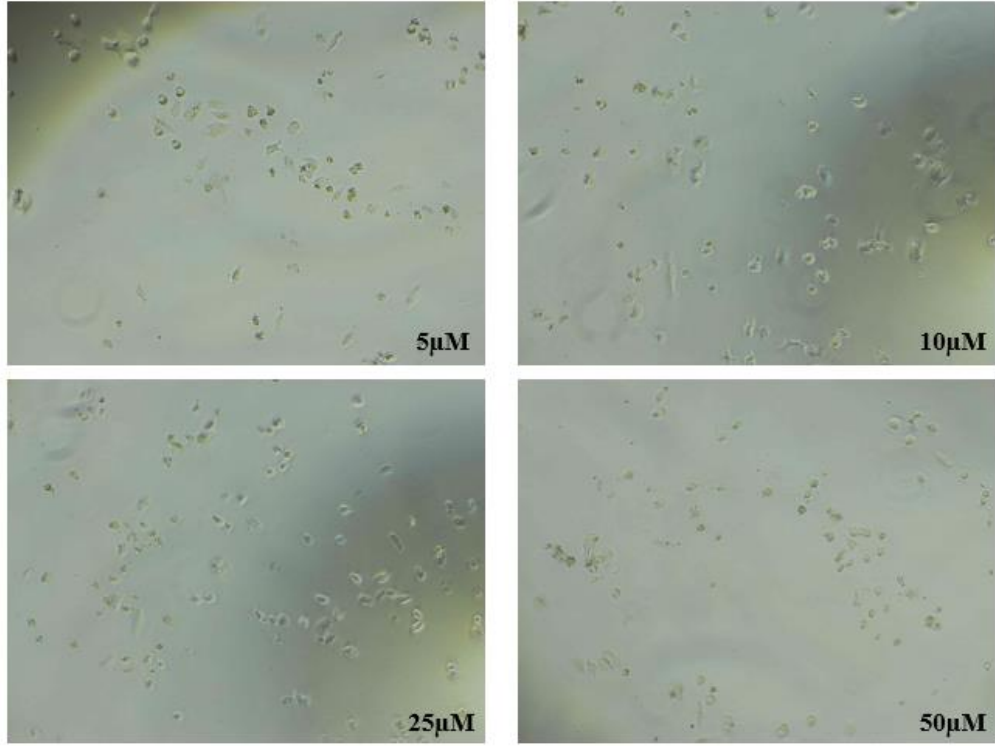
Tablo 2. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Mitoksantronun % inhibisyon değerleri

Mitoksantron konsantrasyonu (μ M)	% İnhibisyon
0.1	41.88
0.5	45.18
1	53.04
5	56.26
10	81.37

Faz kontrast mikroskobu altında hücre canlılıkları kontrol edildi. Şekil 9’da A549 hücre hatları gösterildi ve Şekil 10’da Dosetakselin farklı konsantrasyonların daki hücre hatları gösterildi.



Şekil 9. A549 hücre hattının faz kontrast mikroskobunda 10x büyütmedeki görüntüsü



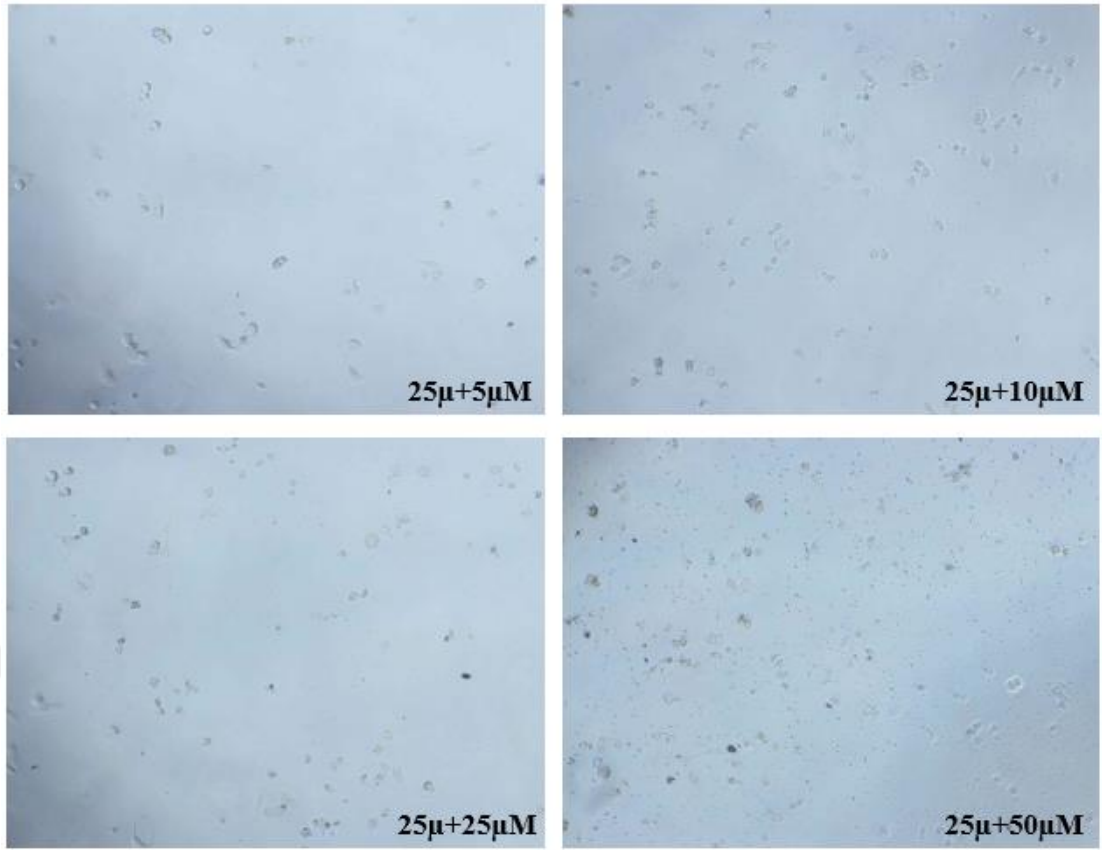
Şekil 10. Dosetakselin 5 μ M-50 μ M konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskopunda 10x büyütmedeki görüntüleri

Faz kontrast mikroskobu altında hücre hatları gözlemlendi. 10x büyütmede farklı konsantrasyonlarda canlı hücreler gözlemlendi. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Dosetakselin inhibisyon değerleri (%) Tablo 3'te verildi.

Tablo 3. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Dosetakselin % inhibisyon değerleri

Dosetaksel konsantrasyonu (μ M)	% İnhibisyon
5	58.52
10	62.50
25	63.32
50	65.24

Faz kontrast mikroskobu altında hücre canlılıkları kontrol edildi. Şekil 11'de Gallik asit ve Dosetaksel ilaç kombinasyonlarının farklı konsantrasyonlarındaki hücre hatları gösterildi.



Şekil 11. Gallik asit 25 μ M ve Dosetaksel 5 μ M-50 μ M konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskobunda 10x büyütmedeki görüntüleri

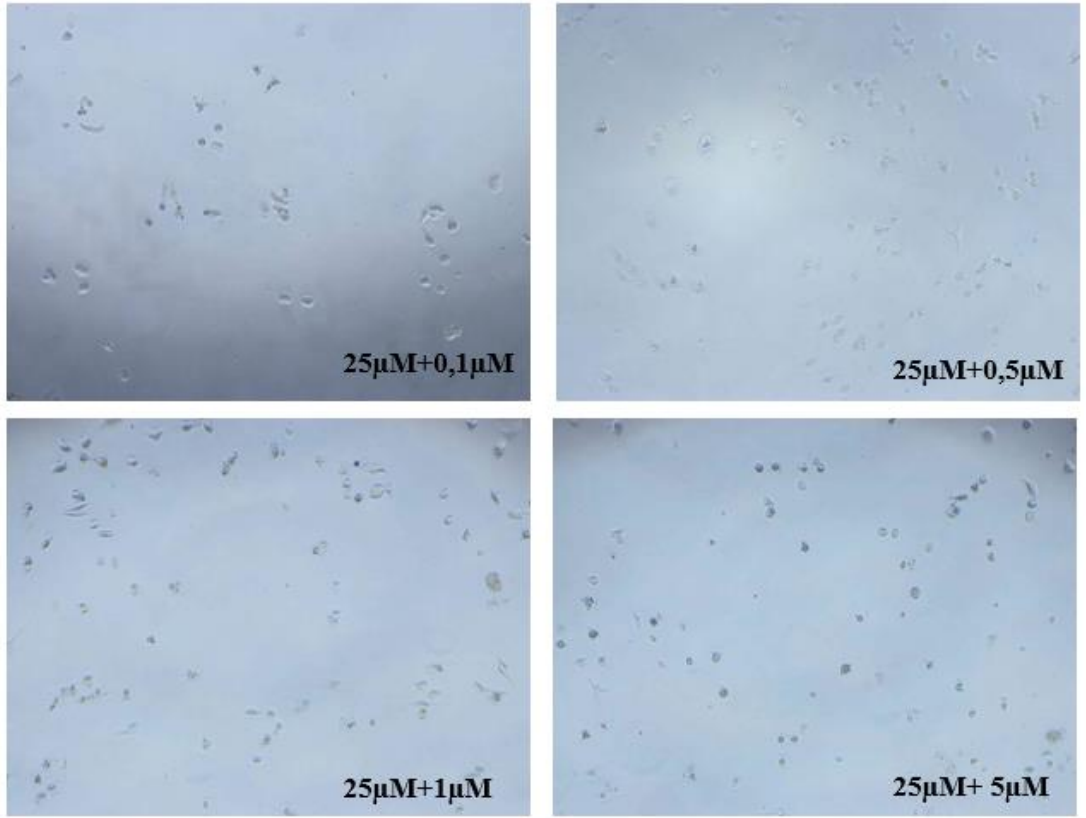
A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonlarının inhibisyon değerleri (%) Tablo 4’te verildi.

Tablo 4. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonlarının % inhibisyon değerleri

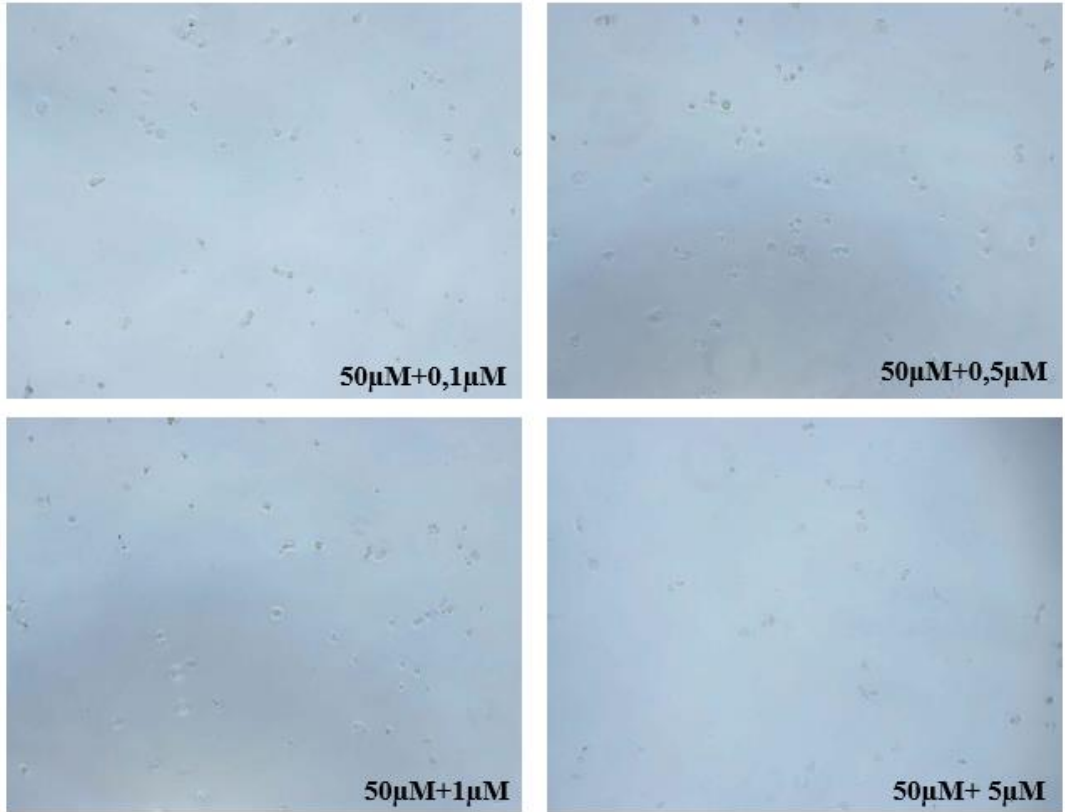
Gallik asit-Dosetaksel konsantrasyonu (μ M)	% İnhibisyon
25 + 5	47.06
25 + 10	52.92
25 + 25	49.45
25 + 50	40.75

Gallik asit ve Dosetaksel ilaç kombinasyonlarının A549 hücre hatlarına inhibisyon sonuçlarında tutarlı bir etki gözlenmedi.

Faz kontrast mikroskobu altında hücre canlılıkları kontrol edildi. Şekil 12 ve Şekil 13’te Gallik asit ve Mitoksantron ilaç kombinasyonlarının farklı konsantrasyonların daki hücre hatları gösterildi.



Şekil 12. Gallik asit 25µM ve Mitoksantron 0.1µM-5µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskobunda 10x büyütmedeki görüntüleri



Şekil 13. Gallik asit 50µM ve Mitoksantron 0.1µM-5µM konsantrasyon aralıklarında faz kontrast mikroskobunda 10x büyütmedeki görüntüleri

A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonlarının inhibisyon değerleri (%) Tablo 5’te verildi.

Tablo 5. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonlarının % inhibisyon değerleri

Gallik asit (μM) +	% İnhibisyon	Gallik asit (μM) +	% İnhibisyon
Mitoksantron (μM)		Mitoksantron (μM)	
25 + 0.1	68.81	50 + 0.1	62.07
25 + 0.5	74.92	50 + 0.5	54.38
25 + 1	78.71	50 + 1	64.22
25 + 5	83.86	50 + 5	74.52

3.1.2. CompuSyn Değerlendirilmesi

Gallik asit ve Mitoksantronun XTT metodu uygulanan sonuçlara ait; elde edilen absorbans değerleri, dozları ve CI değerleri Tablo 6’da, Gallik asit ve Dosetakselin değerleri ise Tablo 7’de verildi.

Tablo 6. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Mitoksantronun kombinasyonlarının XTT metoduna göre bulunan ve Compusyn programına girilen doz ve absorbans değerleri

GA-MIX Konsantrasyonu (μM)	Absorbans	CI değeri	GA-MIX Konsantrasyonu (μM)	Absorbans	CI değeri
25 + 0.1	0.732	0.02962	50 + 0.1	0.891	0.358
25 + 0.5	0.589	0.00523	50 + 0.5	1.071	2.559
25 + 1	0.5	0.00154	50 + 1	0.84	0.231
25 + 5	0.379	0.00031	50 + 5	0.598	0.0167

Tablo 6’daki değerler doğrultusunda Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonlarının 25 μM kullanılan Gallik asit kombinasyonlarının 4 dozu için, 50 μM kullanılan kombinasyonların 2 dozu için $\text{CI} < 1$ olarak bulunmuştur. Kombinasyon için en etkin dozların 25 μM + 0.5 μM (CI: 0.00523) olduğu karar verildi.

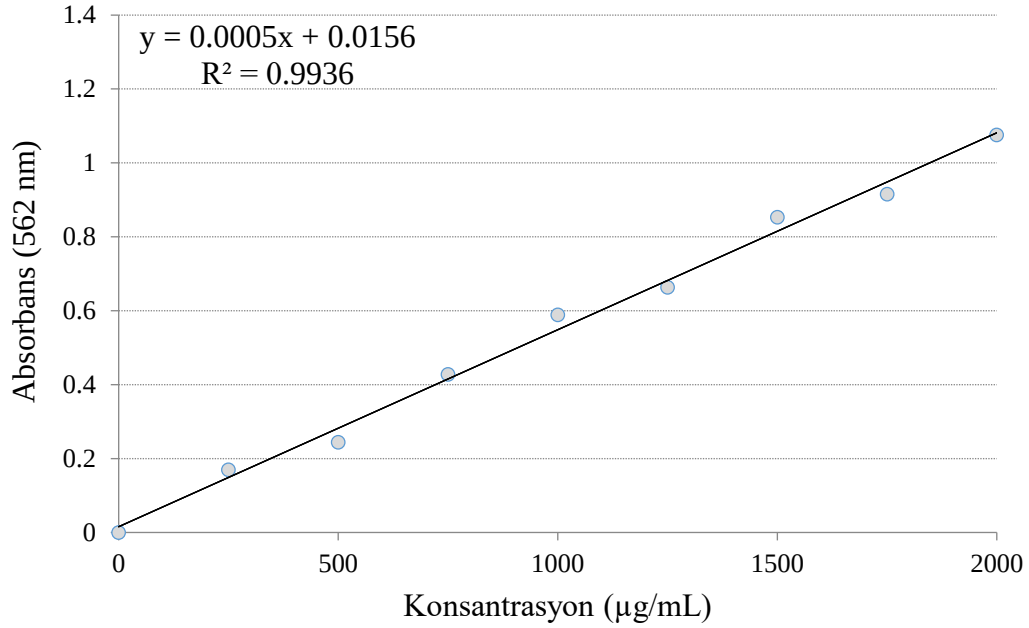
Tablo 7. A549 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonlarının XTT metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz ve absorbans değerleri

Gallik asit -Dosetaksel Konsantrasyonu (μM)	Absorbans	CI değeri
25 + 5	1.243	74.077
25 + 10	1.106	19.297
25 + 25	1.187	151.910
25 + 50	1.392	6579.410

Tablo 7'deki değerler doğrultusunda Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonlarının hiğbir dozu için CI < 1 olarak bulunamamıştır.

3.1.3. BCA (Bisinkoninik asit) Protein Tayini Bulguları

BCA protein analizi sonucu standart grafiği Şekil 14'te verildi. Değerlerin yer aldığı veriler Tablo 8 ve Tablo 9'da gösterildi.



Şekil 14. BCA protein tayini için kullanılan sığır serum albümin standart grafiği

Tablo 8. Farklı konsantrasyonlardaki standart BSA absorbans değerleri

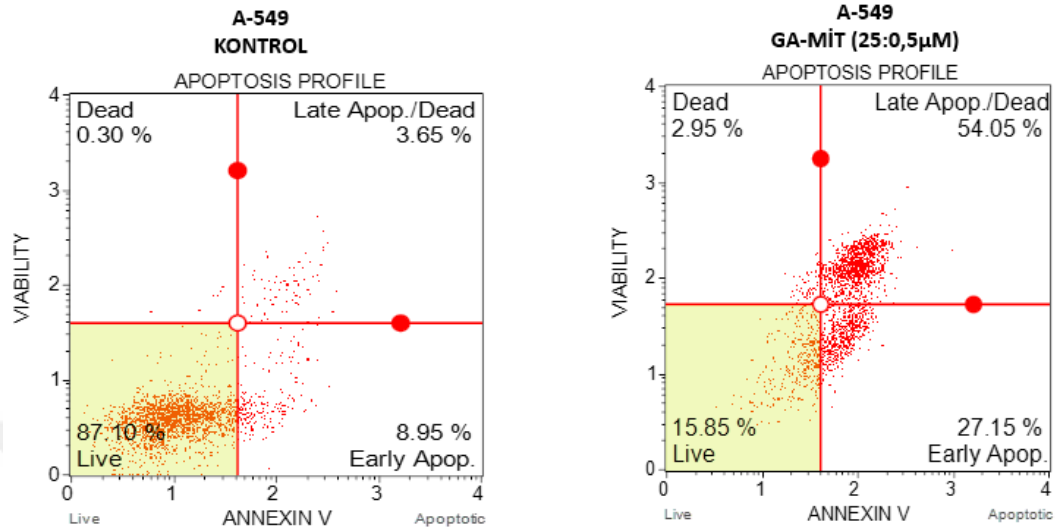
BSA Konsantrasyon (μg/mL)	Absorbans ± SS
2000	1.076 ± 0.017
1750	0.915 ± 0.010
1500	0.853 ± 0.008
1250	0.663 ± 0.003
1000	0.589 ± 0.011
750	0.427 ± 0.012
500	0.244 ± 0.018
250	0.169 ± 0.006

Tablo 9. Protein Konsantrasyonları

rnek Adı	Absorbans ± SS	Protein Konsantrasyonu (μg/mL)
A549 Kontrol	1.675 ± 0.0175	3319.80
Gallik asit (25 μM) + Mitoksantron (0.5 μM)	1.669 ± 0.0025	3305.80

3.1.4. Apoptoz Testinin Değerlendirilmesi

Gallik asit ve Mitoksantronun apoptoz testi yapıldı, sonuçlara ait veriler Şekil 15'te gösterildi.



Şekil 15. Gallik asit ve Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM) kombinasyonunun A549 hücre hattındaki apoptoz sonuçları

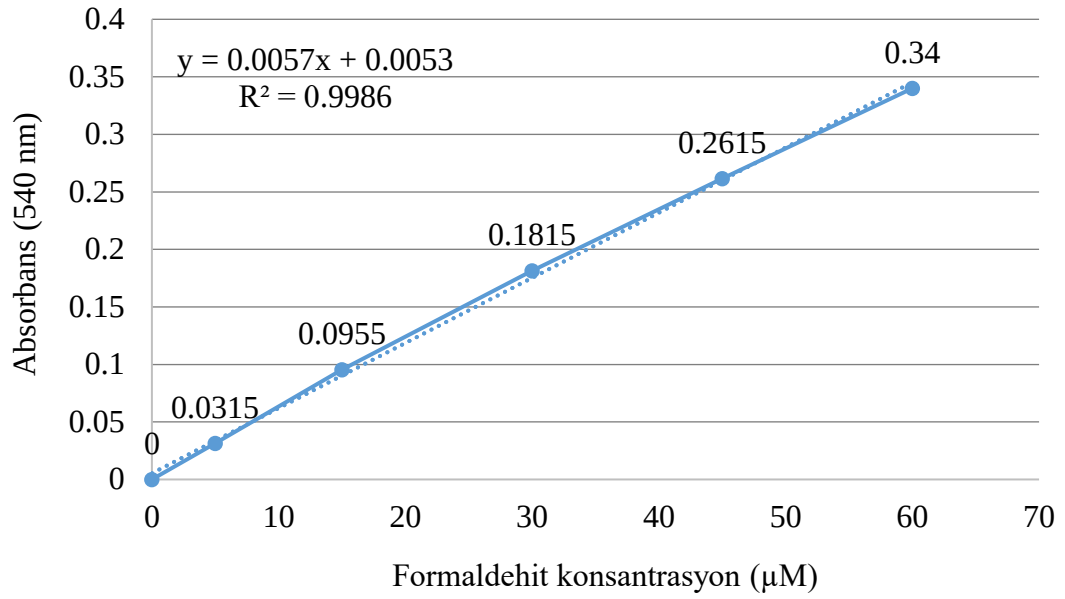
Tablo 10. A549 kanser hücresi ve Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM) apoptotik değerleri

	A549 Kontrol	Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM)
Canlı Hücre (%)	87.10	15.85
Erken Apoptoz (%)	8.95	27.15
Geç Apoptoz (%)	3.65	54.05
Hücre Apoptozu (%)	0.30	2.95

3.1.5. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

3.1.5.1. Katalaz (CAT) Enzimi Aktivite Ölçüm Bulguları

CAT enzim aktivitesi analizi sonucu standart grafiği Şekil 16'da verildi. Değerlerin yer aldığı veriler Tablo 11'de gösterildi.



Şekil 16. Katalaz (CAT) enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için kullanılan formaldehit standart grafiği

Tablo 11. Farklı konsantrasyonlardaki formaldehit standardına karşılık ölçülen absorbans sonuçları

Formaldehit konsantrasyon (µM)	Absorbans ± SS
0	0 ± 0.001
5	0.0315 ± 0.0015
15	0.0955 ± 0.0255
30	0.1815 ± 0.0015
45	0.2615 ± 0.0465
60	0.34 ± 0.005

Şekil 16'daki formaldehit standart grafiğinden ve Eşitlik 1 ve 2'den yararlanarak A549 (kontrol) ve Gallik asit-Mitoksantron değerlerinin CAT üzerine etkisi hesaplandı.

$$\text{Formaldehit } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Örnek absorbansı} - (\text{grafikteki } y \text{ değeri kesen değer})}{0.0057} \times 8.5 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

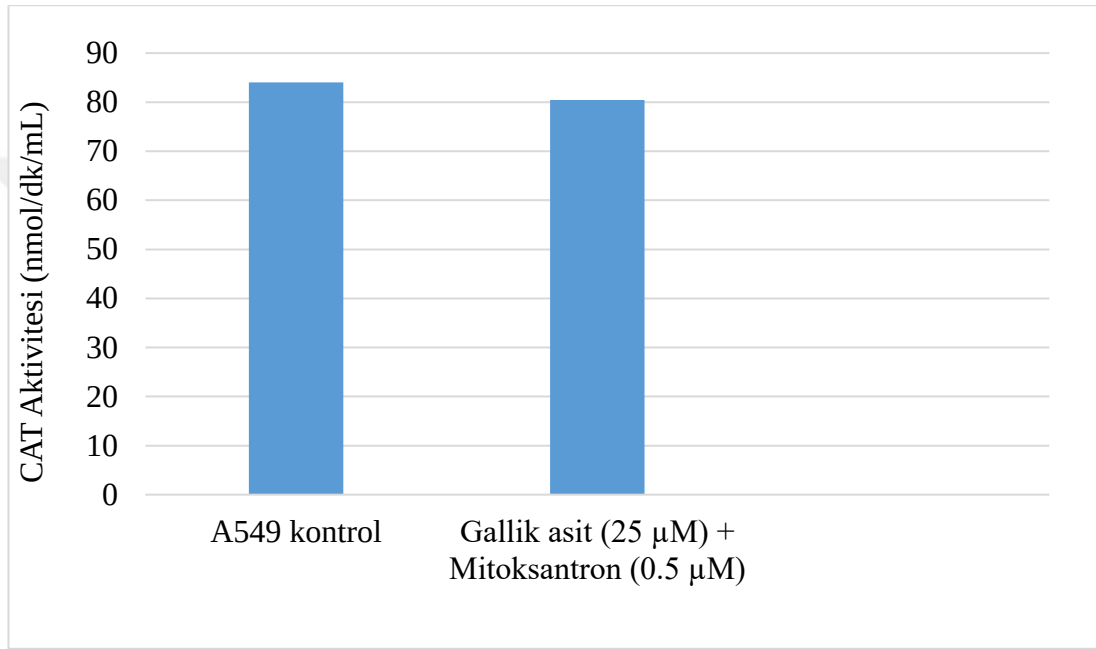
$$\text{CAT aktivitesi} = \frac{\text{Örneğin } \mu\text{M}}{20\text{dk.}} \times \text{seyreltme} = \text{nmol/dk/Ml} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Değerler yukarıdaki Eşitlik 1 ve 2 göre hesaplandı ve Tablo 12'de verildi.

Tablo 12. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu hesaplanan CAT aktivitesi (nmol/dk/mL) sonuçları

Örnekler	CAT Aktivitesi (nmol/dk/mL)
A549 (Kontrol)	84.041
Gallik asit (25 μ M) + Mitoksantron (0.5 μ M)	80.448

Yukarıdaki değerlere göre sütun grafiği Şekil 17’de gösterildi.

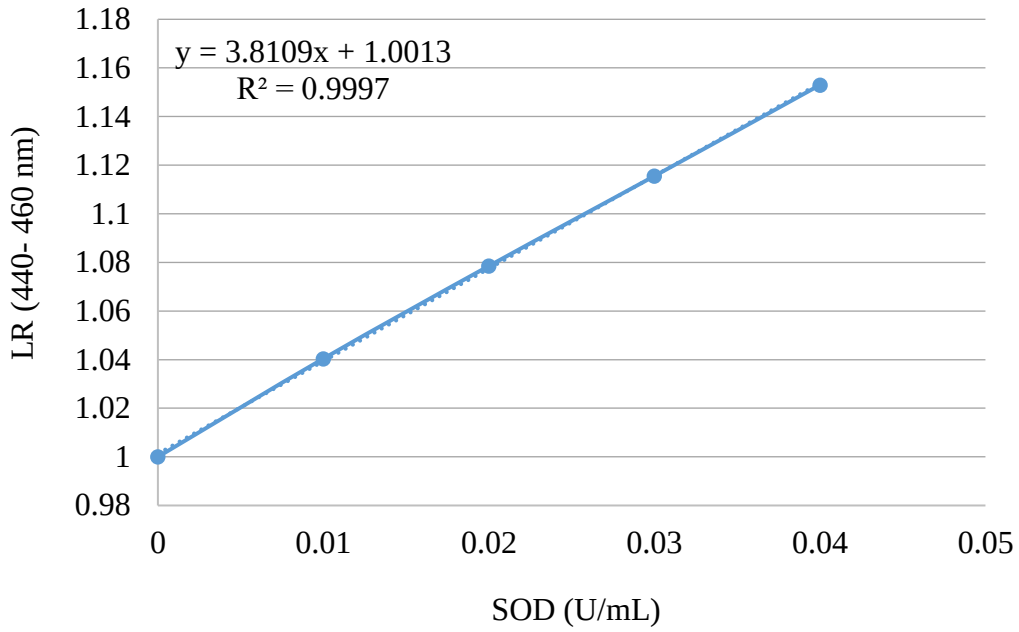


Şekil 17. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen CAT aktivitesi (nmol/dk/mL) sütun grafiği

Elde edilen sonuçların spesifik aktiviteleri hesaplandığında ise A549 kontrol değeri 0.0253 EU/mg ve Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M) değeri ise 0.0243 EU/mg olarak bulunmuştur.

3.1.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Aktivite Ölçüm Bulguları

SOD enzim aktivitesi analizi sonucu standart grafiği Şekil 18’de verildi. Değerlerin yer aldığı veriler Tablo 13’te gösterildi.



Şekil 18. Süperoksit dismutaz (SOD) standart grafik

Tablo 13. Farklı konsantrasyonlardaki SOD enzim konsantrasyonuna karşılık ölçülen absorbens değerleri

SOD (U/mL)	Absorbans $\pm$ SS
0	0.309 $\pm$ 0.001
0.01	0.297 $\pm$ 0.015
0.02	0.286 $\pm$ 0.0025
0.03	0.277 $\pm$ 0.001
0.04	0.268 $\pm$ 0.024

Şekil 18'deki standart grafiğinden ve Eşitlik 3 formülünden yararlanarak Gallik asit-Mitoksantron değerlerinin SOD değerleri hesaplandı.

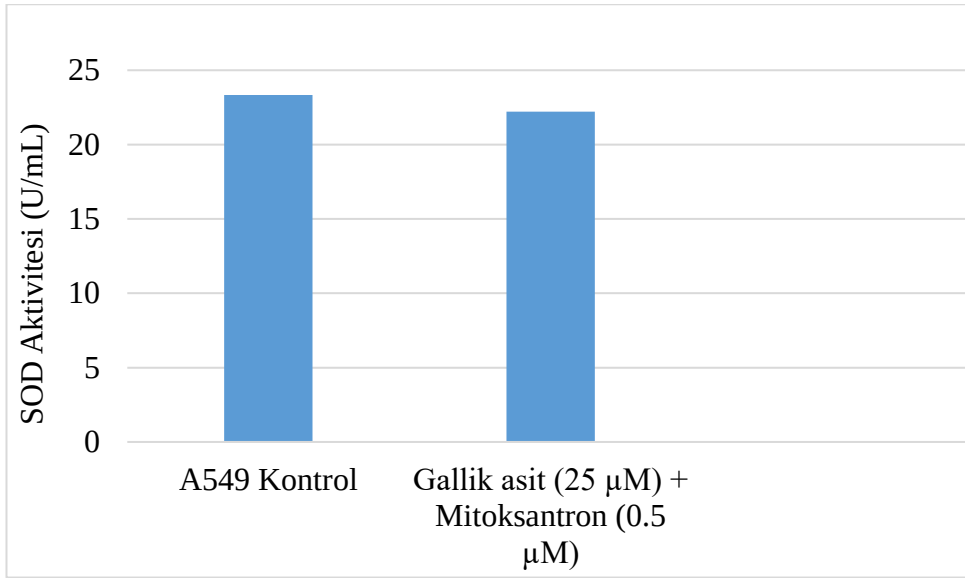
$$\text{SOD (U/mL)} = \left[\frac{\text{Örneğin LR değeri} - (\text{grafikteki y değerini kesen değer})}{3.8109} \times 23 \right] \times \text{seyreltme faktörü} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Değerler Eşitlik 3 göre hesaplandı ve Tablo 14'te verildi.

Tablo 14. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu hesaplanan SOD aktivitesi (U/mL) sonuçları

Örnekler	SOD (U/mL)
A549 (Kontrol)	23.325
Gallik asit (25 μ M) + Mitoksantron (0.5 μ M)	22.213

Yukarıdaki değerlere göre sütun grafiği Şekil 19'da gösterildi.



Şekil 19. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen SOD aktivitesi (U/mL) sütun grafiği

Elde edilen sonuçların spesifik aktiviteleri hesaplandığında ise A549 kontrol değeri 7.026 EU/mg ve Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM) değeri ise 6.719 EU/mg olarak bulunmuştur.

3.1.5.3. Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzimi Aktivite Ölçüm Bulguları

GST enzim aktivitesini belirlemek amacıyla 340 nm’de 5 dakika boyunca her dakika da hem enzimatik kuyularda hemde numunelerde absorbans ölçümü yapıldı. Ard arda gelen iki zaman belirlenerek numunelerde ölçülen değerlerden enzimatik olmayan kuyucuklarda ölçülen absorbans değerleri birbirinden çıkarılarak Eşitlik 4’e göre dakikadaki absorbans farkı ($\Delta A_{340}/dk$) hesaplandı.

$$\Delta A_{340}/dk = \frac{A_{340}(\text{ikinci zaman}) - A_{340}(\text{birinci zaman})}{\text{ikinci zaman}(dk) - \text{birinci zaman}(dk)} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Enzimatik olmayan kuyular ve absorbans değerlerini bir önceki zamandan çıkartarak ΔA_{340} hesaplandı.

Hesaplanan değerler Eşitlik 5’te yerine konularak GST aktivitesi hesaplandı.

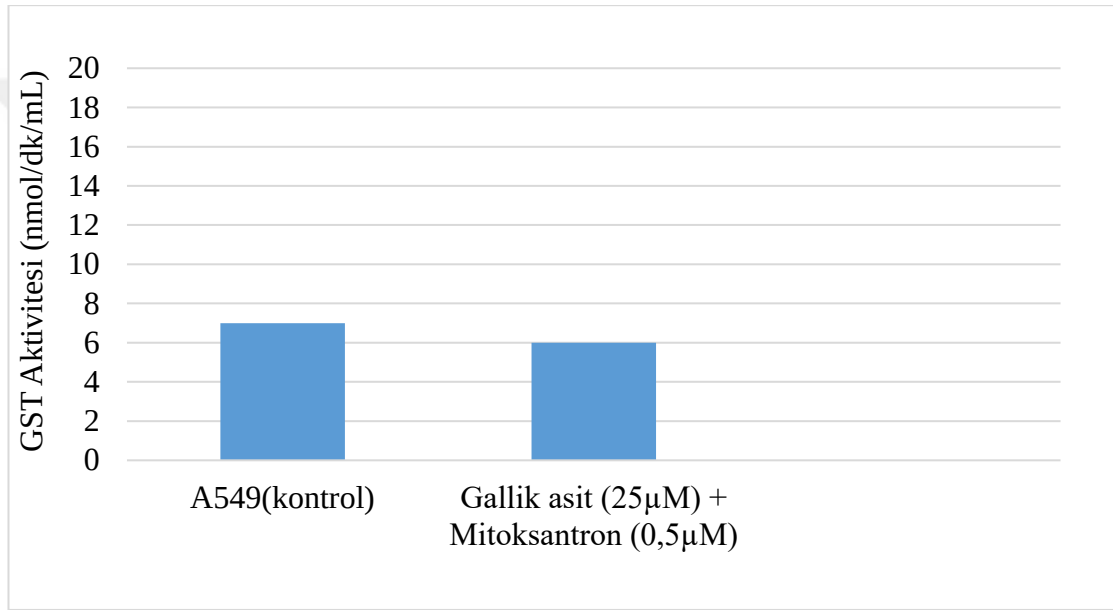
$$\text{GST aktivitesi} = \frac{\Delta A_{340}/dk}{0.00503 \mu M^{-1}} \times 10 \times \text{seyreltme oranı} = \text{nmol/dk/mL} \quad (\text{Eşitlik 5})$$

Hesaplanan GST aktivitesi değerleri Tablo 15’te verildi.

Tablo 15. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu hesaplanan Δ_{A340} ve GST aktivitesi (nmol/dk/mL) sonuçları

Örnekler	Δ_{A340}	GST Aktivitesi (nmol/dk/mL)
A549(kontrol)	0.0035	6.958
Gallik asit (25 μ M) + Mitoksantron (0.5 μ M)	0.0030	5.964

Yukarıdaki değerlere göre sütün grafiği Şekil 20’de gösterildi.

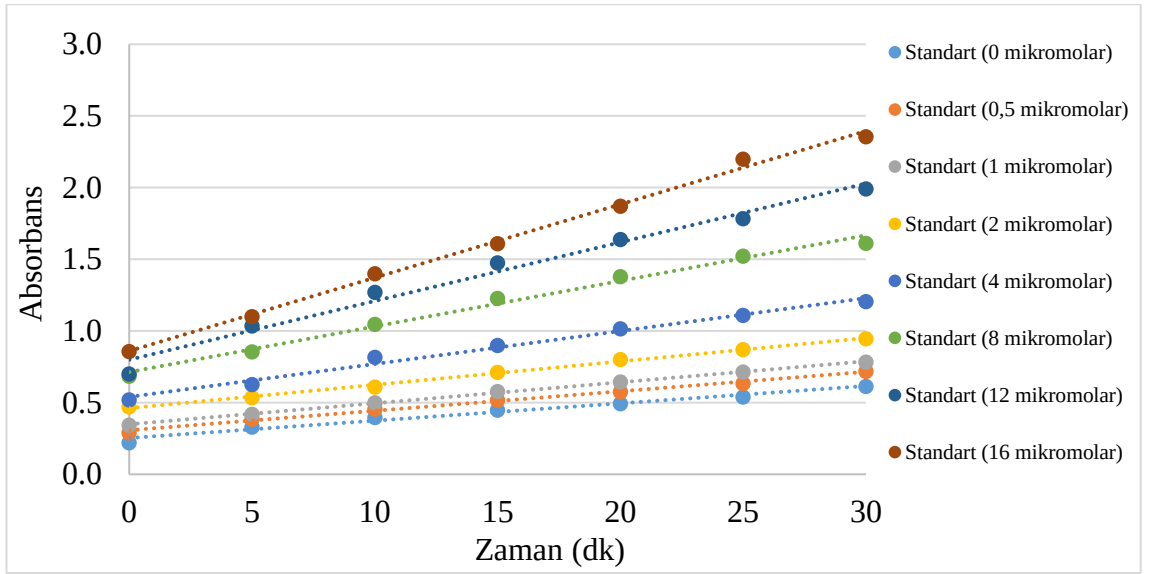


Şekil 20. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu zilen GST aktivitesi (nmol/dk/mL) sütün grafiği

Elde edilen sonuçların spesifik aktiviteleri hesaplandığında ise A549 kontrol değeri 0.00209 EU/mg ve Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M) değeri ise 0.00180 EU/mg olarak bulunmuştur.

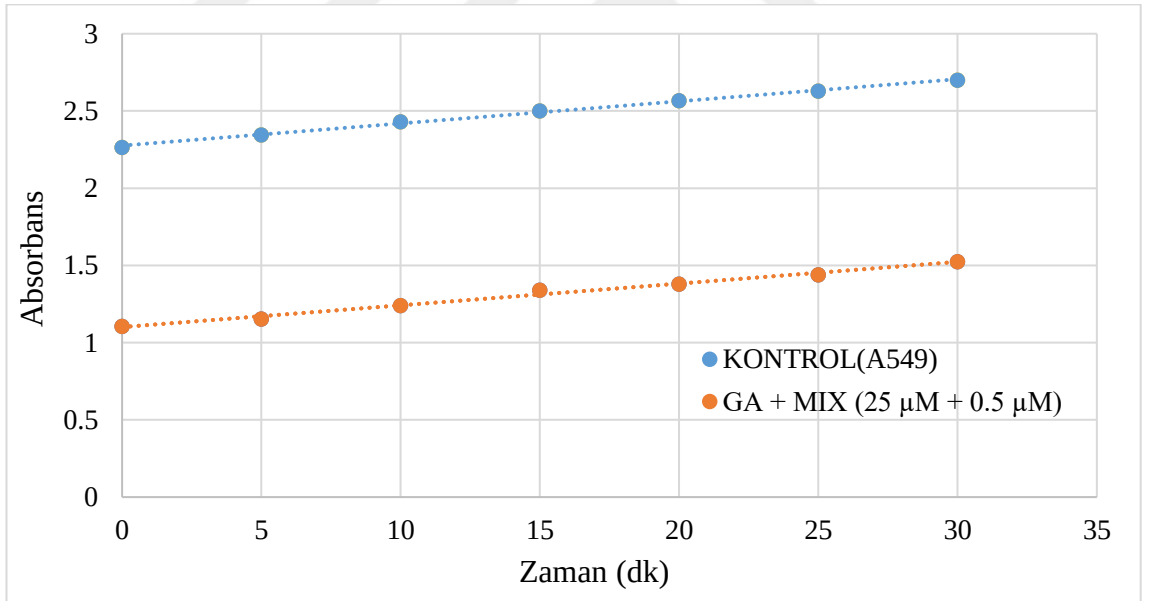
3.1.5.4. Glutatyon Redüktaz (GR) Enzimi Aktivite lm Bulguları

Aktivitenin belirlenmesi amacıyla öncelikle her bir standart ve numune için 410 nm’de 30 dakika boyunca 5 dakikalık aralıklarla lm yapılarak ortalama absorbans değerleri bulundu. Absorbans zaman graği zildi (Şekil 21 ve Şekil 22). Her bir standart ve numune için zilen grafiklerin eğimleri belirlendi. Bu eğim değeri i-slope olarak adlandırıldı.



Şekil 21. Farklı konsantrasyonlarda (0-16 μM) GSH standardı kullanılarak çizilen absorbens zaman grafiği

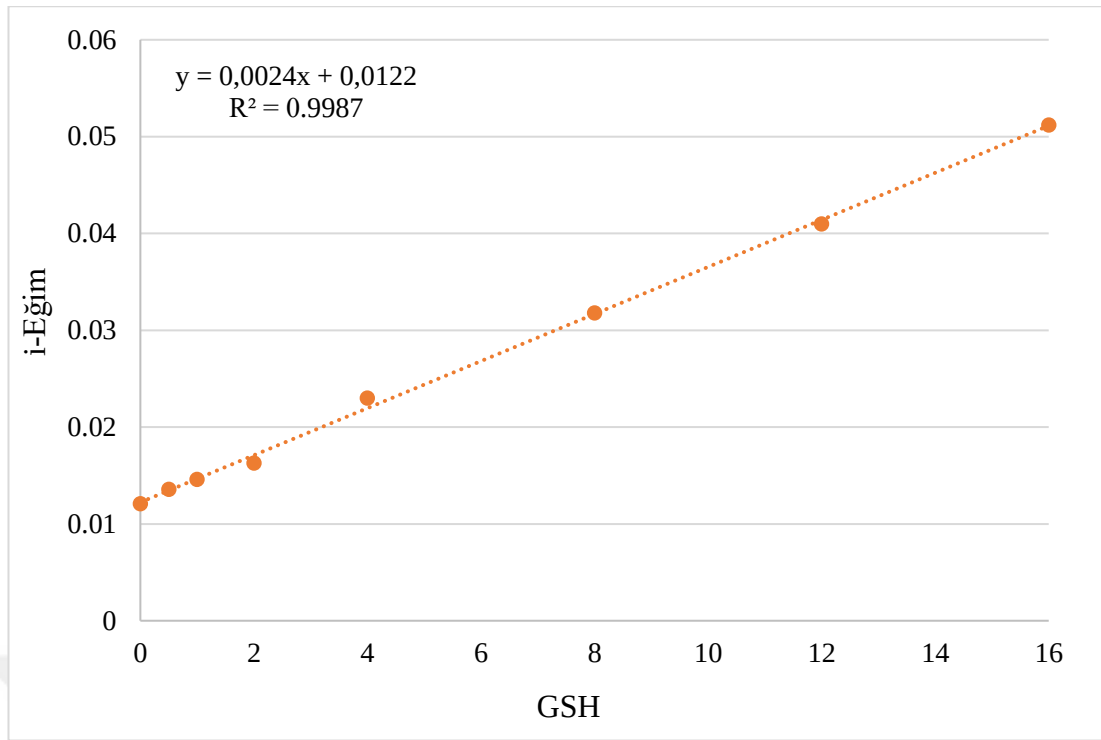
A549 kontrol grubu ve fenolik madde + ilaç (Gallik asit + Mitoksantron (25 μM + 0.5 μM)) 0-30 dk aralığında elde edilen absorbens değerleri Şekil 22’de gösterildi.



Şekil 22. GR aktivitesini belirlemek amacıyla kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μM + 0.5 μM)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen absorbens zaman grafiği

GSH’nin bir fonksiyonu olarak her bir standartın i-slope değerlerine karşılık çizilen grafiğin eğimi belirlendi. Bu eğime ise f-eğim adı verildi. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak her bir numunenin toplam GSH değeri bulundu.

$$\text{Toplam GSH} = [(\text{Numune için i-eğim}) - (\text{y-kesişim noktası}) / (\text{f-eğim})] \quad (\text{Eşitlik 6})$$



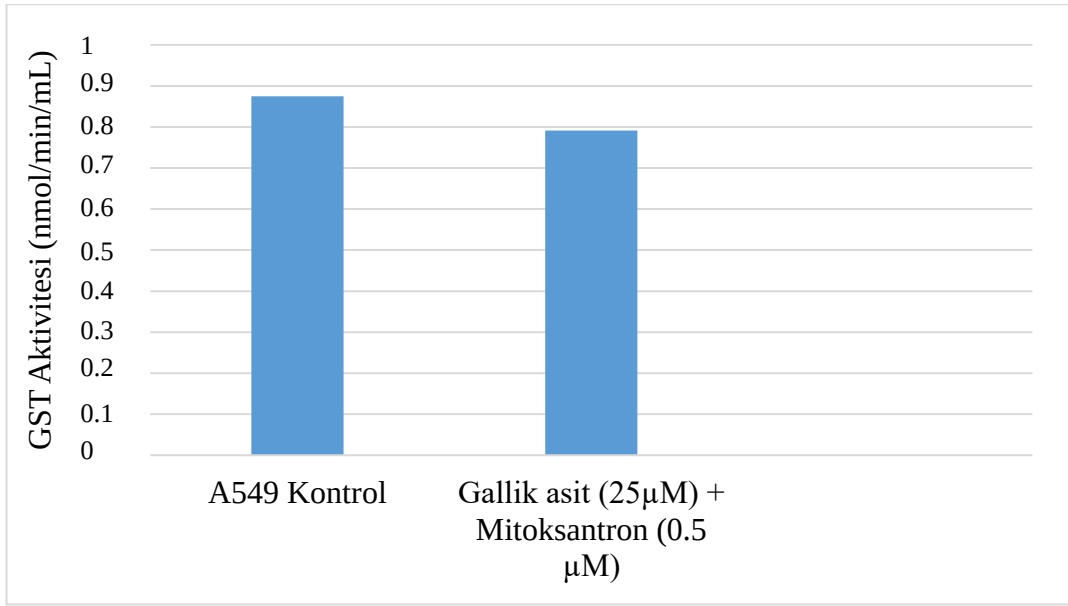
Şekil 23. GR enzim aktivitesini belirlemek amacıyla çizilen i-eğim GSH grafiği

Tablo 16. Kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu hesaplanan i-eğim değerleri ve GSH konsantrasyonu (μ M) sonuçları

Örnekler	i-Eğimi	GSH Konsantrasyonu (μ M)
A549(kontrol)	0.0143	0.875
Gallik asit (25 μ M) + Mitoksantron (0.5 μ M)	0.0141	0.791

Elde edilen sonuçların spesifik aktiviteleri hesaplandığında ise A549 kontrol değeri 0.263 μ M/mg ve Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M) değeri ise 0.239 μ M/mg olarak bulunmuştur.

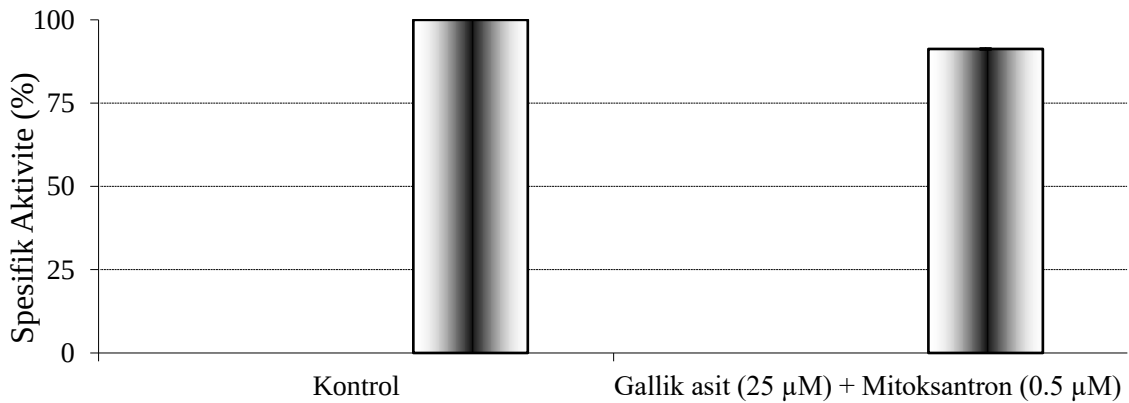
Yukarıdaki değerlere göre sütun grafiği Şekil 24'te gösterildi.



Şekil 24. GR aktivitesini belirlemek amacıyla kombinasyonun (Gallik asit + Mitoksantron (25 µM + 0.5 µM)) A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerine uygulanması sonucu çizilen GSH konsantrasyonu (µM) sütun grafiği

3.1.6. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Akciğer kanser (A549) hücresi üzerine Gallik asit ve Mitoksantron ilaç kombinasyonunun (25 µM + 0.5 µM) uygulanması sonucu ve ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücresinden alınan protein örneklerinde kontrol aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek ilaç kombinasyonu aktivitesi absorbans değerlerine göre hesaplanmış mevcut spesifik enzim aktivitesi % 91.016 olarak bulundu. Sonuç olarak 24 saat sonunda alınan ilaç kombinasyonu uygulanan hücreden alınan protein örneğinde enzim aktivitesinin % 8.984 oranında düştüğü gözlemlendi. Sonuçlar Şekil 25'te gösterildi.

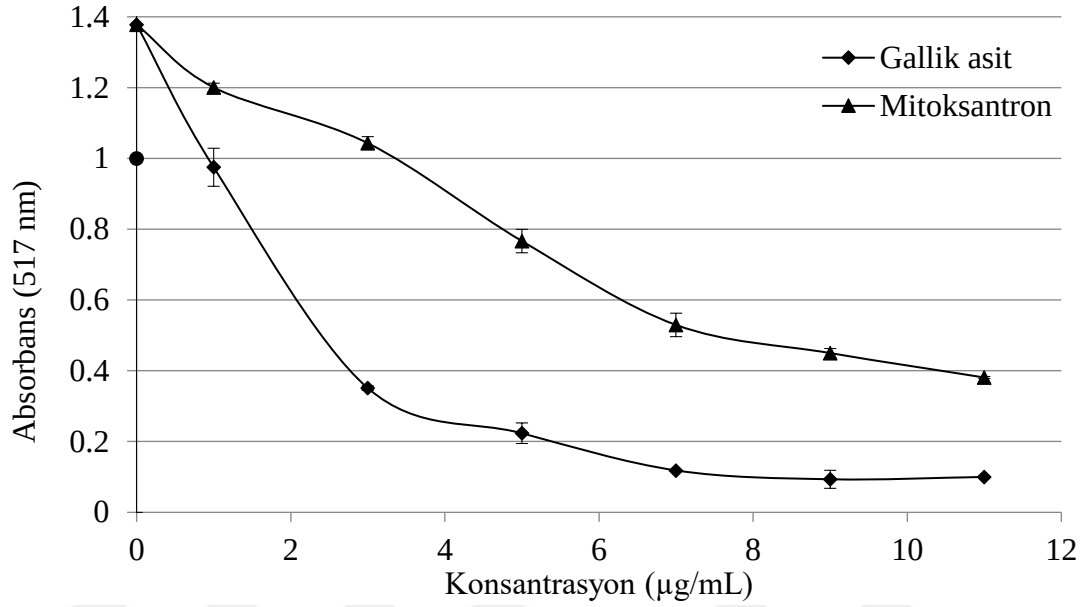


Şekil 25. Akciğer kanser (A549) hücresine Gallik asit ve Mitoksantron ilaç kombinasyonu (25 µM + 0.5 µM) uygulaması sonucu 24 saat sonunda alınan protein örneği için hesaplanan spesifik aktivite grafiği (%)

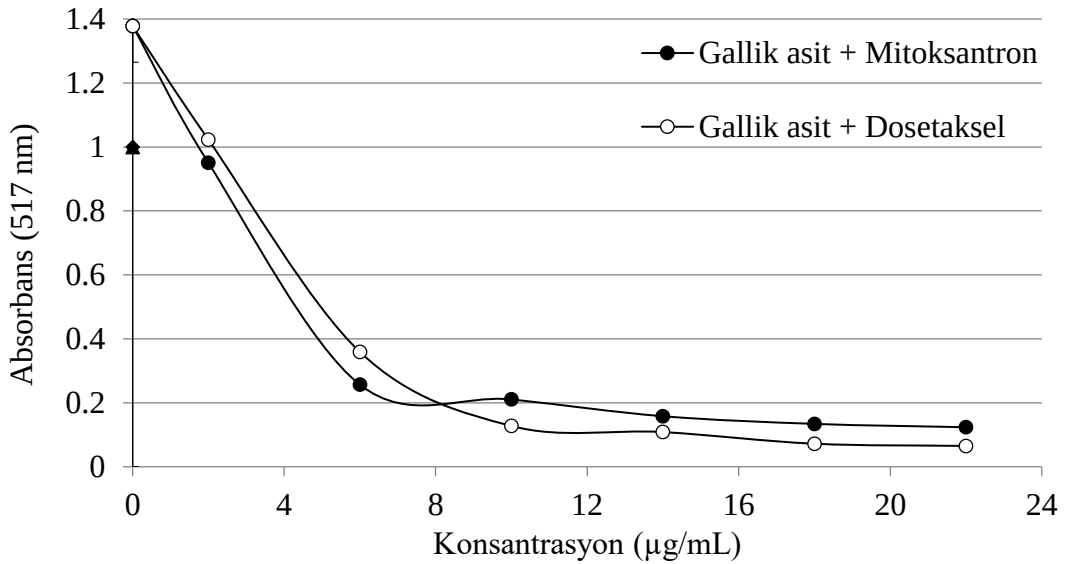
3.2. Antioksidan Aktivite Bulguları

3.2.1. DPPH · Giderme Metodu Bulguları

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonlarının DPPH· giderme aktivitesi, Blois metoduna göre, 517 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi. Sonuçlar grafik edilerek Şekil 26 ve 27'de verildi.



Şekil 26. Gallik asit ve Mitoksantron maddelerinin (1-11 µg/mL) DPPH· giderme aktivitesi grafiği



Şekil 27. Kombinasyonların (Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetaksel) (2-22 µg/mL) DPPH· giderme aktivitesi grafiği

Gallik asit, ilaç ve kombinasyonların DPPH· giderme aktivitesinin, konsantrasyon arttıkça arttığı Şekil 26 ve 27’de görülmektedir. Dosetaksel için konsantrasyon arttıkça absorbansta düzenli bir azalma görülmediğinden grafikte verilmedi ve IC₅₀ değeri hesaplanamadı.

DPPH· giderme aktivitelerini karşılaştırmak amacıyla Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 17’de verildi.

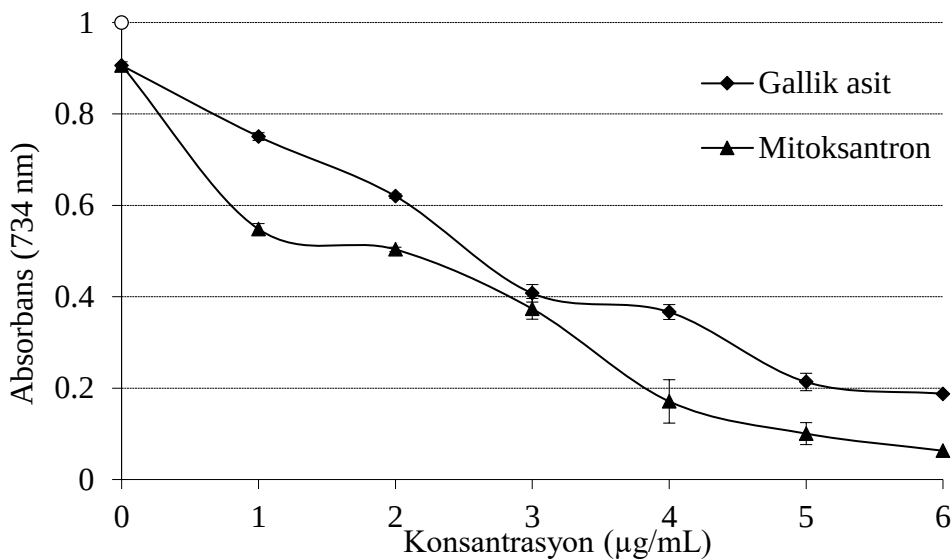
Tablo 17. Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için DPPH· giderme aktivitesi IC₅₀ değerleri

Maddeler ve Kombinasyonları	[IC ₅₀](µg/mL)
Gallik asit	3.020
Mitoksantron	6.556
Dosetaksel	-
Gallik asit+ Mitoksantron	5.675
Gallik asit + Dosetaksel	5.957

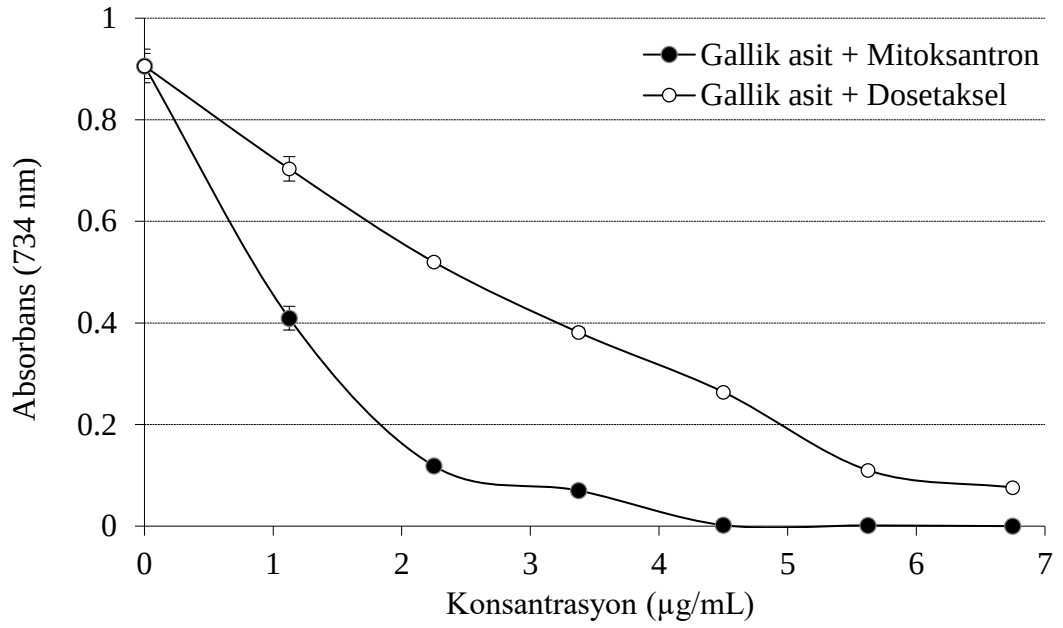
Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için; hesaplanan DPPH· giderme aktivitesi sırasıyla Gallik asit > Gallik asit + Mitoksantron > Gallik asit + Dosetaksel > Mitoksantron olarak belirlendi (Tablo 17).

3.2.2. ABTS⁺ Giderme Metodu Bulguları

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonlarının ABTS⁺ giderme aktivitesi, Re ve arkadaşlarının metoduna göre, 734 nm’deki absorbansları ölçülerek belirlendi. Sonuçlar grafik edilerek Şekil 28 ve 29’da verildi.



Şekil 28. Gallik asit ve Mitoksantron maddelerinin (1-6 µg/mL) ABTS⁺ giderme aktivitesi grafiği



Şekil 29. Kombinasyonların (Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetaksel) (1.125-6.750 µg/mL) ABTS⁺ giderme aktivitesi grafiği

Dosetaksel için konsantrasyon arttıkça düzenli bir azalma görülmediğinden grafikte verilmemiş ve IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır. Bu metot için Gallik asit konsantrasyonu 1:8 oranında çalışıldığından grafik çizilirken (Şekil 29) bu durum dikkate alınmıştır.

ABTS⁺ giderme aktivitelerini karşılaştırmak amacıyla Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 18'de verildi.

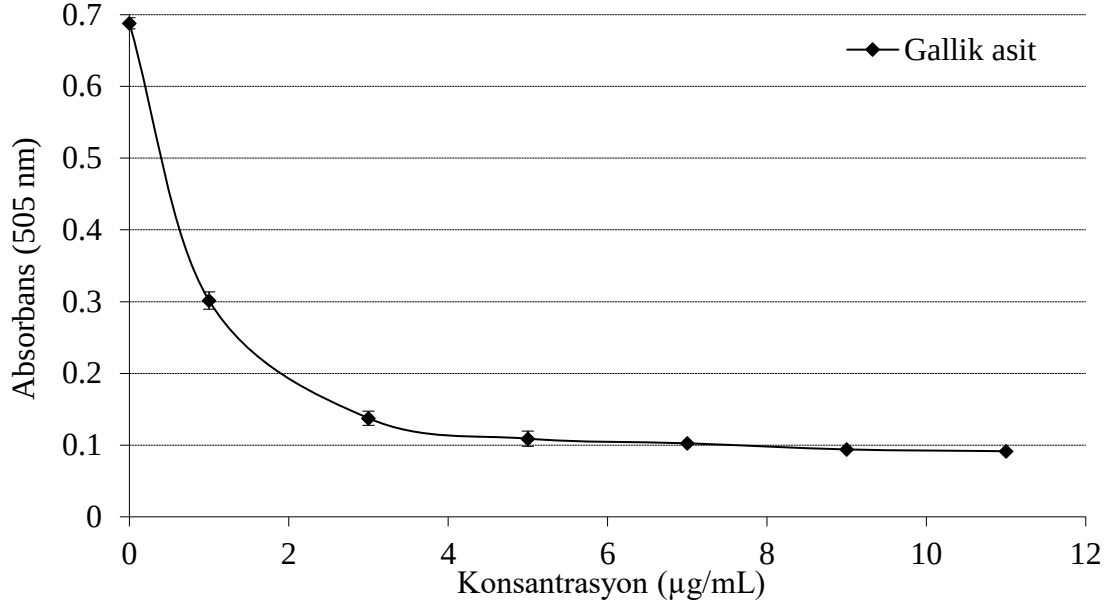
Tablo 18. Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için ABTS⁺ giderme aktivitesi IC₅₀ değerleri

Maddeler ve Kombinasyonları	[IC ₅₀](µg/mL)
Gallik asit	0.322
Mitoksantron	2.461
Dosetaksel	-
Gallik asit+ Mitoksantron	1.323
Gallik asit + Dosetaksel	3.133

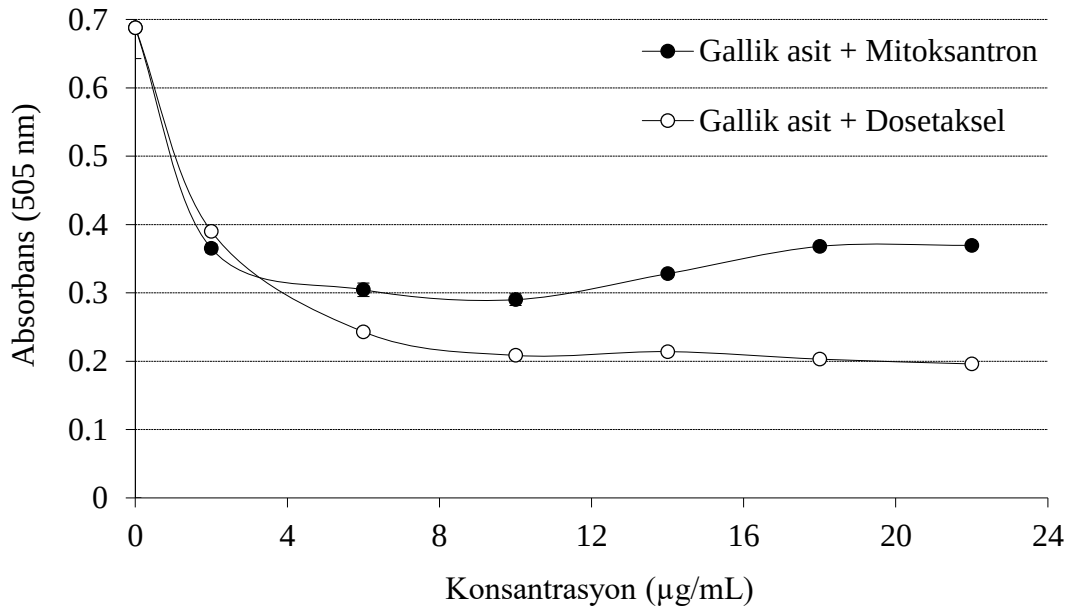
Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için; 1-6 µg/mL konsantrasyon aralığında hesaplanan ABTS⁺ giderme aktivitesi sırasıyla Gallik asit > Gallik asit + Mitoksantron > Mitoksantron > Gallik asit + Dosetaksel olarak belirlendi (Tablo 18).

3.2.3. DMPD⁺ Giderme Metodu Bulguları

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonlarının DMPD⁺ giderme aktivitesi, Fogliona ve arkadaşlarının metoduna göre, 505 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi. Sonuçlar grafik edilerek Şekil 30 ve 31'de verildi.



Şekil 30. Gallik asidin farklı konsantrasyonlardaki (1-11 µg/mL) DMPD⁺ giderme aktivitesi grafiği



Şekil 31. Kombinasyonların (Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetaksel) (1.125-6.750 µg/mL) DMPD⁺ giderme aktivitesi grafiği

Dosetaksel ve Mitoksantron için konsantrasyon arttıkça düzenli bir azalma görülmediğinden grafikte verilmemiş ve IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

DMPD⁺ giderme aktivitelerini karşılaştırmak amacıyla Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 19’da verildi.

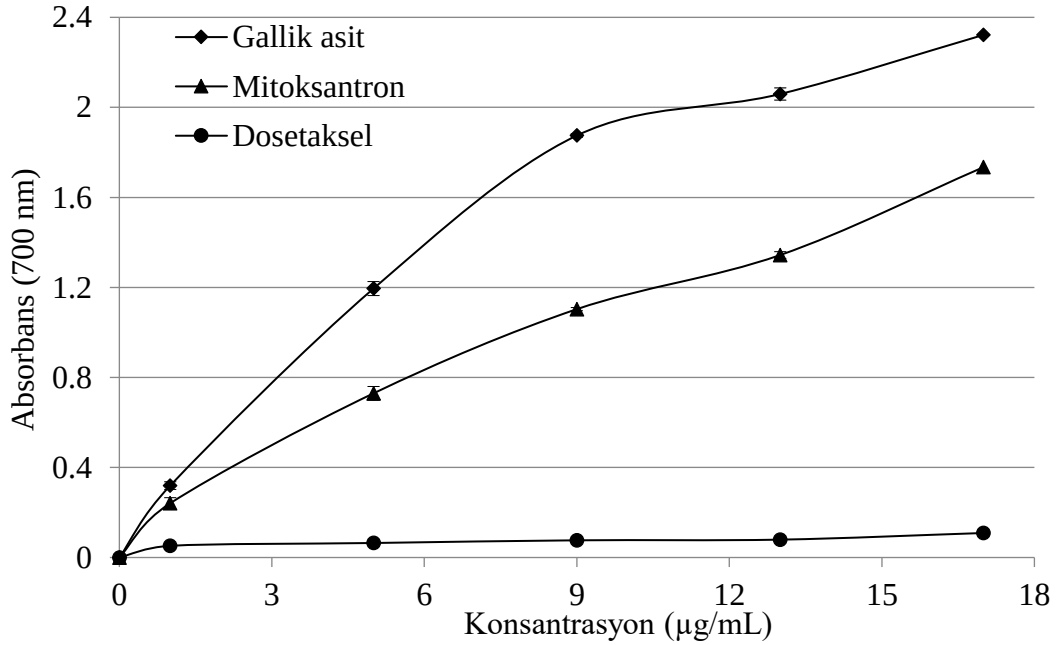
Tablo 19. Gallik asit ve kombinasyonları için DMPD⁺ giderme aktivitesi IC₅₀ değerleri

Maddeler ve Kombinasyonları	[IC ₅₀](µg/mL)
Gallik asit	1.967
Gallik asit+ Mitoksantron	15.935
Gallik asit + Dosetaksel	8.036

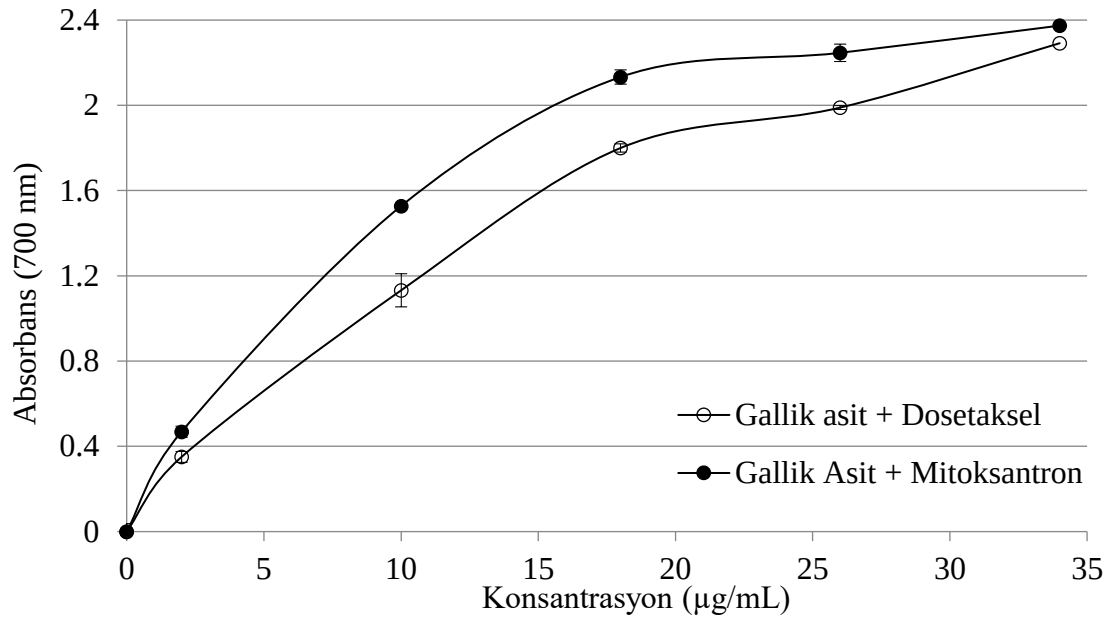
Gallik asit ve kombinasyonları için; hesaplanan DMPD⁺ giderme aktivitesi sırasıyla Gallik asit > Gallik asit + Dosetaksel > Gallik asit + Mitoksantron olarak belirlendi (Tablo 19).

3.2.4. Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgenme Kapasitesi Metodu Bulguları

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonlarının Ferrik iyonları (Fe³⁺-Fe²⁺) indirgeme kapasitesi, Oyaizu metodunun hafif bir modifikasyonuna göre, 700 nm’deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Sonuçlar grafik edilerek Şekil 32 ve 33’te verildi.



Şekil 32. Gallik asit, Mitoksantron ve Dosetaksel maddelerinin farklı konsantrasyonlardaki (1-17 µg/mL) Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kapasitesi grafiği



Şekil 33. Kombinasyonların (Gallik asit + Dosetaksel ve Gallik asit + Mitoksantron) (2-34 µg/mL) Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi grafiği

Dosetakselin konsantrasyon artışına bağlı olarak absorbans artışı önemsenmeyecek kadar küçüktür. Diğer tüm maddeler ve kombinasyonları için konsantrasyon ile birlikte absorbans artışı gözlemlendi.

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonların 5 µg/mL'deki absorbans değerleri Tablo 20'de verilerek birbirleriyle karşılaştırıldı.

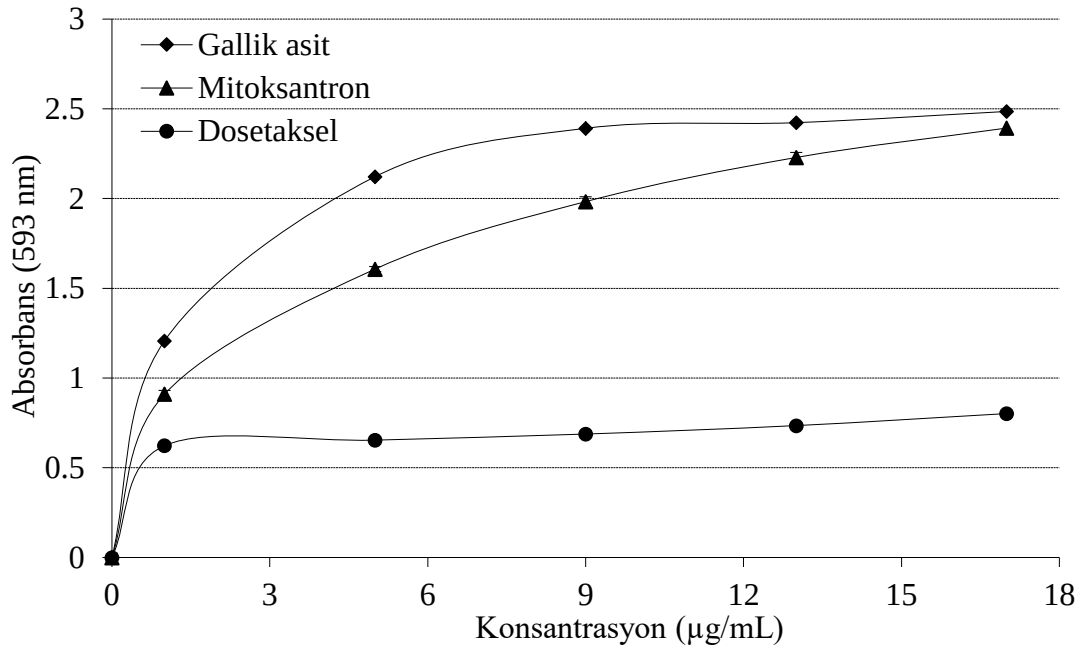
Tablo 20. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi metoduna göre; Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için 5 µg/mL'de ölçülen absorbans değerleri

Maddeler ve Kombinasyonları	Absorbans (700 nm) ± SS
Gallik asit	1.195 ± 0.017
Mitoksantron	0.730 ± 0.024
Dosetaksel	0.064 ± 0.002
Gallik asit + Mitoksantron	0.764 ± 0.026
Gallik asit + Dosetaksel	0.538 ± 0.025

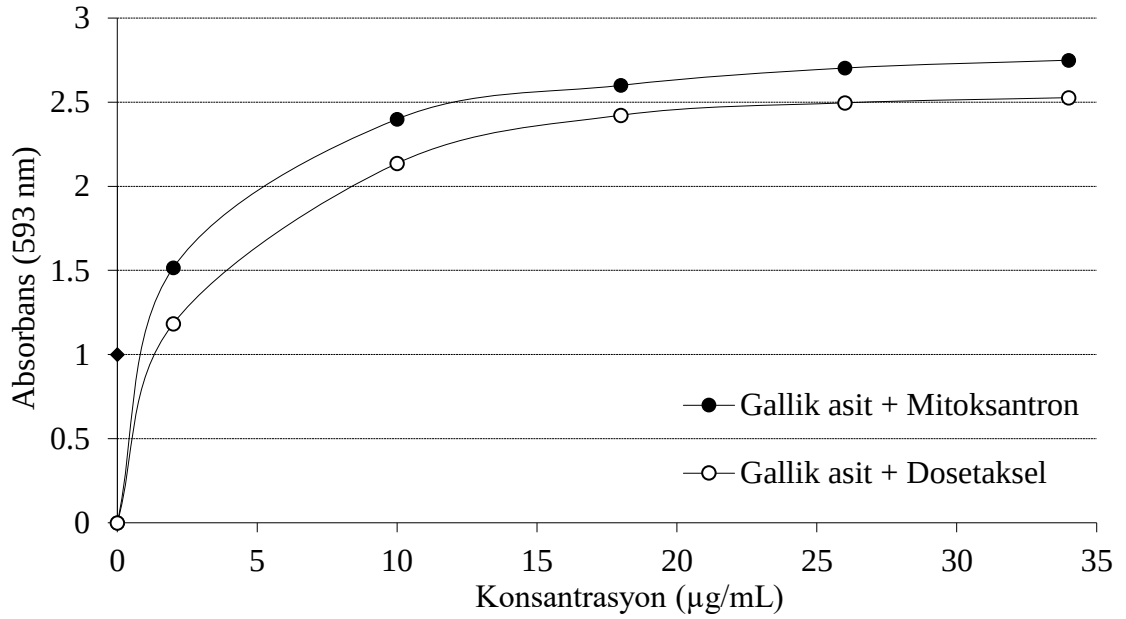
Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için; 5 µg/mL konsantrasyonda Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi sırasıyla Gallik asit > Gallik asit + Mitoksantron > Mitoksantron > Gallik asit + Dosetaksel > Dosetaksel olarak belirlendi (Tablo 20).

3.2.5. Fe^{3+} - Fe^{2+} Kapasitesi (FRAP) Metodu Bulguları

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonlarının Frap metoduna göre Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi, 593 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi. Sonuçlar grafik edilerek Şekil 34 ve 35'te verildi.



Şekil 34. Gallik asit, Mitoksantron ve Dosetaksel maddelerinin (1-17 µg/mL) Frap metoduna göre Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi grafiği



Şekil 35. Kombinasyonların (Gallik asit + Dosetaksel ve Gallik asit + Mitoksantron) (2-34 µg/mL) Frap metoduna göre Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi grafiği

Dosetakselin konsantrasyon artışına bağlı olarak absorbans artışı önemsenmeyecek kadar küçüktür. Diğer tüm maddeler ve kombinasyonları için konsantrasyon ile birlikte absorbans artışı gözlemlendi.

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonların 5 µg/mL'deki absorbans değerleri Tablo 21'de verilerek birbirleriyle karşılaştırıldı.

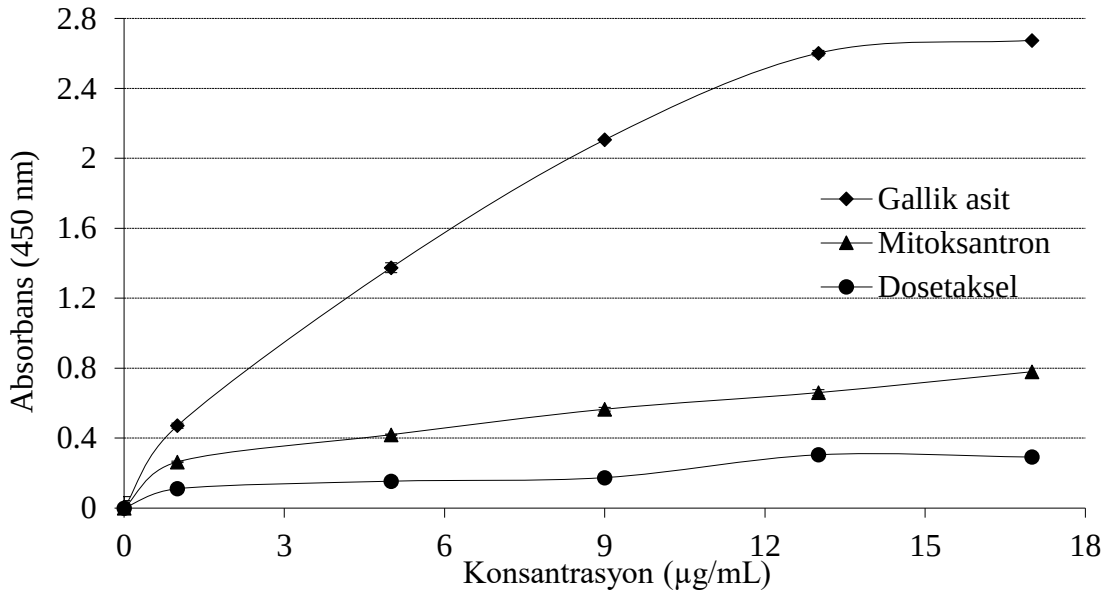
Tablo 21. Frap Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi metoduna göre; Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için 5 $\mu\text{g/mL}$ 'de ölçülen absorbans değerleri

Maddeler ve Kombinasyonları	Absorbans (593 nm) $\pm$ SS
Gallik asit	2.122 ± 0.011
Mitoksantron	1.607 ± 0.021
Dosetaksel	0.654 ± 0.008
Gallik asit + Mitoksantron	1.200 ± 0.002
Gallik asit + Dosetaksel	1.067 ± 0.006

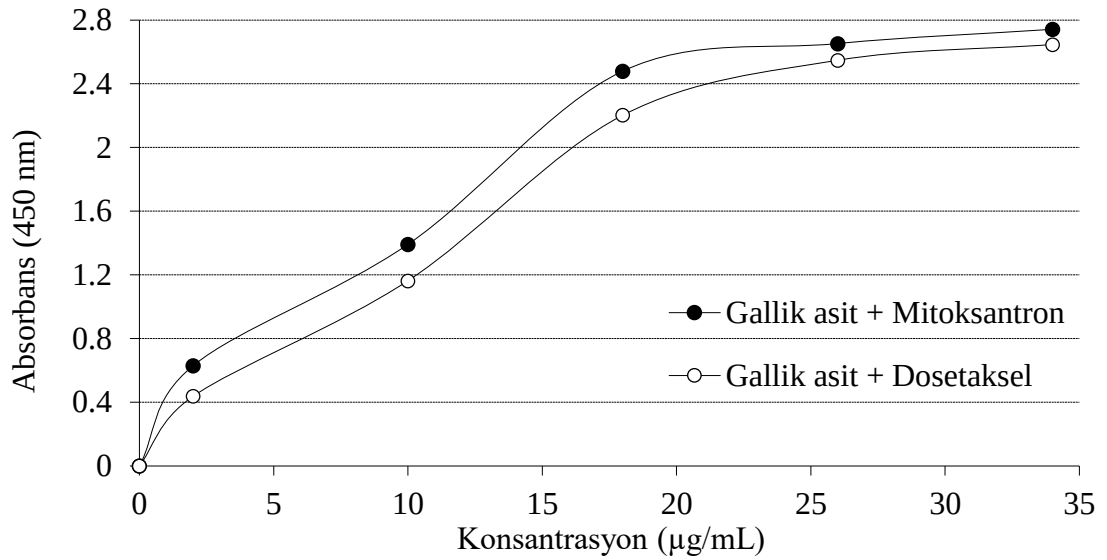
Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için; 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda Frap metoduna göre Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi sırasıyla Gallik asit > Mitoksantron > Gallik asit + Mitoksantron > Gallik asit + Dosetaksel > Dosetaksel olarak belirlendi (Tablo 21).

3.2.6. Cu^{2+} - Cu^{1+} İndirgenme (Kuprak) Metodu Bulguları

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonlarının Kuprak metoduna göre Kuprik iyonlarını (Cu^{2+} - Cu^{1+}) indirgeme kapasitesi, Apak ve arkadaşlarının metodunun hafif bir modifikasyonuna göre 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Sonuçlar grafik edilerek Şekil 36 ve 37'de verildi.



Şekil 36. Gallik asit, Mitoksantron ve Dosetaksel maddelerinin (1-17 $\mu\text{g/mL}$) Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme kapasitesi grafiği



Şekil 37. Kombinasyonların (Gallik asit + Dosetaksel ve Gallik asit + Mitoksantron) (2-34 µg/mL) Cu²⁺-Cu¹⁺ indirgeme kapasitesi grafiği

Dosetaksel ve Mitoksantronun konsantrasyon artışına bağlı olarak absorbans artışı önemsenmeyecek kadar küçüktür. Diğer tüm maddeler ve kombinasyonları için konsantrasyon ile birlikte absorbans artışı gözlenmektedir.

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonların 5 µg/mL'deki absorbans değerleri Tablo 22'de verilerek birbirleriyle karşılaştırıldı.

Tablo 22. Cu²⁺-Cu¹⁺ indirgeme kapasitesi metoduna göre; Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için 5 µg/mL'de ölçülen absorbans değerleri

Maddeler ve Kombinasyonları	Absorbans (450 nm) ± SS
Gallik asit	1.375 ± 0.015
Mitoksantron	0.420 ± 0.004
Dosetaksel	0.154 ± 0.004
Gallik asit + Mitoksantron	0.696 ± 0.008
Gallik asit + Dosetaksel	0.582 ± 0.006

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için; 5 µg/mL konsantrasyonda Cu²⁺-Cu¹⁺ indirgeme kapasitesi sırasıyla Gallik asit > Gallik asit + Mitoksantron > Gallik asit + Dosetaksel > Mitoksantron > Dosetaksel olarak belirlendi (Tablo 22).

3.2.7. *In Vitro* Antioksidan Aktivite Bulgularının Sinerjik Etkilerinin Belirlenmesi

Etkin kombinasyon değerini (CI) belirlemek amacıyla *in vitro* çalışılan antioksidan metodlarında Gallik asit, Kemoterpi ilaçları ve kombinasyonları için

bulunan absorbans değerleri CompuSyn programına uygulandı. Böylece sinerjik etkisi bulunan kombinasyonlar için etkin dozlar ve hangi metodlarda etkin oldukları belirlendi. Program 1’den büyük değerleri kabul etmediğinden her metot içerisinde bulunan 1’den büyük olan en büyük değer 0.999 olarak alınarak diğer değerler orantı yoluyla tekrar hesaplandı. 1’ den büyük değerler içeren metotlardaki bulgular her metot içerisinde bu şekilde orantı oluşturularak programa uygulandı. Kombinasyon etki değeri (CI) 1’den küçük olmayan sonuçlar önemli olmadığından çalışma sonucunda verildi.

Tablolarda verilen isimler aşağıdaki şekilde kısaltılarak kullanıldı.

Kombinasyon Etki Değeri: CI

Konsantrasyon: Doz ($\mu\text{g/mL}$)

3.2.7.1. DPPH• Giderme Metodu Bulguları

Tablo 23 ve 24’te DPPH• giderme metodu uygulanarak Gallik asit, Dosetaksel ve kombinasyonu için elde edilen absorbans değerleri, dozları ve verilerin CompuSyn programına girilmesiyle elde edilen CI değerleri verildi.

Tablo 23. Gallik asit ve Dosetakselin DPPH• giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz ve absorbans değerleri

Gallik asit Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit Absorbans	Dosetaksel Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Dosetaksel Absorbans
1.000	0.709	1.000	0.999
3.000	0.255	3.000	0.993
5.000	0.163	5.000	0.987
7.000	0.086	7.000	0.995
9.000	0.068	9.000	0.995
11.000	0.073	11.000	0.992

Tablo 24. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun DPPH• giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz, absorbans ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit + Dosetaksel Absorbans	Gallik asit + Dosetaksel CI
2.000	0.744	1.230
6.000	0.261	0.906
10.000	0.093	0.662
14.000	0.079	0.822
18.000	0.052	0.785
22.000	0.047	0.894

DPPH• giderme metodunda Tablo 24’e göre; Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun 5 dozu için $CI < 1$ olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozun $10 \mu\text{g/mL}$ olabileceği düşünölmektedir ($CI: 0.662$). Aynı zamanda $14 \mu\text{g/mL}$ ($CI: 0.822$)

ve 18 µg/ml (CI: 0.785) dozlarında etkin sinerjik etkiye sahip olabilecekleri görüldü. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunda her doz için CI > 1 değeri bulundu. Bu duruma göre kombinasyonda görülen yüksek antoksidan aktivitenin Gallik asidin antioksidan aktivitesinden kaynaklanabileceğini düşünülmektedir.

3.2.7.2. ABTS^{•+} Giderme Metodu Bulguları

Tablo 25, 26, 27 ve 28'de ABTS^{•+} giderme metodu uygulanarak Gallik asit, Dosetaksel, Mitoksantron ve kombinasyonları için elde edilen absorbands değerleri, dozları ve verilerin CompuSyn programına girilmesiyle elde edilen CI değerleri verildi.

Tablo 25. Gallik asit ve Dosetakselin ABTS^{•+} giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz ve absorbands değerleri

Gallik asit Doz (µg/mL)	Gallik asit Absorbans	Dosetaksel Doz (µg/mL)	Dosetaksel Absorbans
0.125	0.751	1.000	0.903
0.250	0.620	2.000	0.900
0.375	0.408	3.000	0.890
0.500	0.367	4.000	0.872
0.625	0.214	5.000	0.823
0.750	0.188	6.000	0.816

Tablo 26. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun ABTS^{•+} giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz, absorbands ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz (µg/mL)	Gallik asit + Dosetaksel Absorbans	Gallik asit + Dosetaksel CI
1.125	0.704	0.789
2.250	0.520	0.901
3.375	0.382	0.920
4.500	0.264	0.847
5.625	0.110	0.514
6.750	0.076	0.469

Tablo 27. Gallik asit ve Mitoksantron'un ABTS^{•+} giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz ve absorbands değerleri

Gallik asit Doz (µg/mL)	Gallik asit Absorbans	Mitoksantron Doz (µg/mL)	Mitoksantron Absorbans
0.125	0.751	1.000	0.548
0.250	0.620	2.000	0.504
0.375	0.408	3.000	0.374
0.500	0.367	4.000	0.171
0.625	0.214	5.000	0.101
0.750	0.188	6.000	0.063

Tablo 28. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun ABTS^{•+} giderme metoduna göre bulunan ve CompuSyn programına girilen doz, absorbans ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz (µg/mL)	Gallik asit + Mitoksantron Absorbans	Gallik asit + Mitoksantron CI
1.125	0.410	0.858
2.250	0.119	0.615
3.375	0.070	0.640
4.500	0.002	0.090
5.625	0.001	0.072
6.750	0.001	0.087

ABTS^{•+} giderme metodunda Tablo 26'a göre; Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun 6 dozu için CI < 1 olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozların 1.125 µg/ml (CI:0.789), 5.625 µg/ml (CI:0.514) ve 6.750 µg/ml (CI:0.409) olabilecekleri düşünülmektedir. ABTS^{•+} giderme metodunda Tablo 28'e göre; Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun 6 dozu için CI < 1 olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozun 4.500 µg/ml olabileceği düşünülmektedir (CI:0.090). Aynı zamanda 5.625 µg/ml (CI:0.072) ve 6.750 µg/ml (CI: 0.087) dozlarında ki uygulamalarında etkin sinerjik etkiye sahip olabilecekleri düşünülmektedir.

3.2.7.3. Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgenme Metodu Bulguları

Tablo 29, 30, 31 ve 32'de Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme metodu uygulanarak Gallik asit, Dosetaksel, Mitoksantron ve kombinasyonları için elde edilen absorbans değerleri, dozları ve verilerin compusyn programına girilmesiyle elde edilen CI değerleri verildi.

Tablo 29. Gallik asit ve Dosetakselin Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbans değerleri

Gallik asit Doz (µg/mL)	Gallik asit Absorbans	Dosetaksel Doz (µg/mL)	Dosetaksel Absorbans
1.000	0.134	1.000	0.022
5.000	0.503	5.000	0.027
9.000	0.789	9.000	0.032
13.000	0.867	13.000	0.033
17.000	0.977	17.000	0.046

Tablo 30. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbans ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz (µg/mL)	Gallik asit + Dosetaksel Absorbans	Gallik asit + Dosetaksel CI
2.000	0.147	0.764
10.000	0.477	1.474

Tablo 30. (Devamı)

Doz (µg/mL)	Gallik asit + Dosetaksel Absorbans	Gallik asit + Dosetaksel CI
18.000	0.757	1.320
26.000	0.837	1.435
34.000	0.964	0.734

Tablo 31. Gallik asit ve Mitoksantron' un Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbans değerleri

Gallik asit Doz (µg/mL)	Gallik asit Absorbans	Mitoksantron Doz (µg/mL)	Mitoksantron Absorbans
1.000	0.134	1.000	0.101
5.000	0.503	5.000	0.307
9.000	0.789	9.000	0.464
13.000	0.867	13.000	0.566
17.000	0.977	17.000	0.730

Tablo 32. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbans ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz (µg/mL)	Gallik asit + Mitoksantron Absorbans	Gallik asit + Mitoksantron CI
2.000	0.197	1.044
10.000	0.643	1.318
18.000	0.898	0.857
26.000	0.945	0.818
34.000	0.999	0.096

Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metodunda Tablo 30'a göre; Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun 2 dozu için CI < 1 olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozların 2 µg/ml (CI:0.764), ve 34 µg/ml (CI:0.734) olabilecekleri düşünülmektedir. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metodunda Tablo 32'e göre; Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun 3 dozu için CI < 1 olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozun 34 µg/ml olabileceği düşünülmektedir (CI:0.096). Aynı zamanda 18 µg/ml (CI:0.857) ve 26 µg/ml (CI: 0.818) dozlarında ki uygulamalarında etkin sinerjik etkiye sahip olabilecekleri düşünülmektedir.

3.2.7.4. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgenme (FRAP) Metodu Bulguları

Tablo 33, 34, 35 ve 36'da Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme (FRAP) metodu uygulanarak Gallik asit, Dosetaksel, Mitoksantron ve kombinasyonları için elde edilen absorbans değerleri, dozları ve verilerin CompuSyn programına girilmesiyle elde edilen CI değerleri verildi.

Tablo 33. Gallik asit ve Dosetakselin Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme (FRAP) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri

Gallik asit Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit Absorbans	Dosetaksel Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Dosetaksel Absorbans
1.000	0.439	1.000	0.228
5.000	0.771	5.000	0.239
9.000	0.869	9.000	0.251
13.000	0.880	13.000	0.269
17.000	0.903	17.000	0.293

Tablo 34. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme (FRAP) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit + Dosetaksel Absorbans	Gallik asit + Dosetaksel CI
2.000	0.430	1.079
10.000	0.776	0.966
18.000	0.880	0.746
26.000	0.907	0.781
34.000	0.918	0.874

Tablo 35. Gallik asit ve Mitoksantron' un Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbens değerleri

Gallik asit Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit Absorbans	Mitoksantron Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Mitoksantron Absorbans
1.000	0.439	1.000	0.331
5.000	0.771	5.000	0.584
9.000	0.869	9.000	0.720
13.000	0.880	13.000	0.810
17.000	0.903	17.000	0.869

Tablo 36. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbens ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit + Mitoksantron Absorbans	Gallik asit + Mitoksantron CI
2.000	0.551	0.929
10.000	0.872	0.670
18.000	0.945	0.424
26.000	0.982	0.166
34.000	0.999	0.008

Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme (FRAP) metodunda Tablo 34'e göre; Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun 4 dozu için $\text{CI} < 1$ olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozun 18 $\mu\text{g/mL}$ (CI: 0.746) olabileceği düşünülmektedir. 26 $\mu\text{g/mL}$ (CI:0.781) ve 34 $\mu\text{g/mL}$ (CI: 0,874) dozlarında ki uygulamalarında etkin sinerjik etkiye sahip oldukları görülmektedir.

Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme (FRAP) metodunda Tablo 36'ya göre; Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun 5 dozu için $\text{CI} < 1$ olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozun 34 $\mu\text{g/ml}$ olabileceği düşünülmektedir ($\text{CI}:0,008$). Aynı zamanda 18 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{CI}:0,424$) ve 26 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{CI}: 0,166$) dozlarında ki uygulamalarında etkin sinerjik etkiye sahip olabilecekleri düşünülmektedir.

3.2.7.5. Cu^{2+} - Cu^{1+} İndirgenme (Kuprak) Metodu Bulguları

Tablo 37, 38, 39 ve 40'da Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metodu uygulanarak Gallik asit, Dosetaksel, Mitoksantron ve kombinasyonları için elde edilen absorbans değerleri, dozları ve verilerin CompuSyn programına girilmesiyle elde edilen CI değerleri verildi.

Tablo 37. Gallik asit ve Dosetakselin Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbans değerleri

Gallik asit Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit Absorbans	Dosetaksel Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Dosetaksel Absorbans
1.000	0.172	1.000	0.076
5.000	0.501	5.000	0.105
9.000	0.767	9.000	0.120
13.000	0.947	13.000	0.209
17.000	0.974	17.000	0.200

Tablo 38. Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbans ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit + Dosetaksel Absorbans	Gallik asit + Dosetaksel CI
2.000	0.160	0.902
10.000	0.424	1.900
18.000	0.802	1.296
26.000	0.928	0.974
34.000	0.964	0.843

Tablo 39. Gallik asit ve Mitoksantron' un Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz ve absorbans değerleri

Gallik asit Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit Absorbans	Mitoksantron Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Mitoksantron Absorbans
1.000	0.172	1.000	0.096
5.000	0.501	5.000	0.153
9.000	0.767	9.000	0.206
13.000	0.947	13.000	0.241
17.000	0.974	17.000	0.284

Tablo 40. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metoduna göre bulunan CompuSyn programına girilen doz, absorbands ve uygulama sonucu elde edilen CI değerleri

Doz ($\mu\text{g/mL}$)	Gallik asit + Mitoksantron Absorbans	Gallik asit + Mitoksantron CI
2.000	0.229	0.718
10.000	0.507	1.588
18.000	0.903	0.810
26.000	0.966	0.623
34.000	0.999	0.109

Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metodunda Tablo 38'e göre; Gallik asit ve Dosetaksel kombinasyonunun 3 dozu için $\text{CI} < 1$ olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozların 34 $\mu\text{g/ml}$ (CI : 0.843) ve 2 $\mu\text{g/ml}$ (CI :0.902) olabilecekleri düşünülmektedir. Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgeme (Kuprak) metodunda Tablo 40'a göre; Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun 4 dozu için $\text{CI} < 1$ olarak bulundu. Kombinasyon için en etkin dozun 34 $\mu\text{g/ml}$ olabileceği düşünülmektedir (CI :0.101). Aynı zamanda 18 $\mu\text{g/ml}$ (CI :0.810) ve 26 $\mu\text{g/ml}$ (CI : 0.623) dozlarında ki uygulamalarında etkin sinerjik etkiye sahip olabilecekleri düşünülmektedir.

3.3. Karbonik Anhidraz (hCAI, II ve IX) Aktivitesi Bulguları

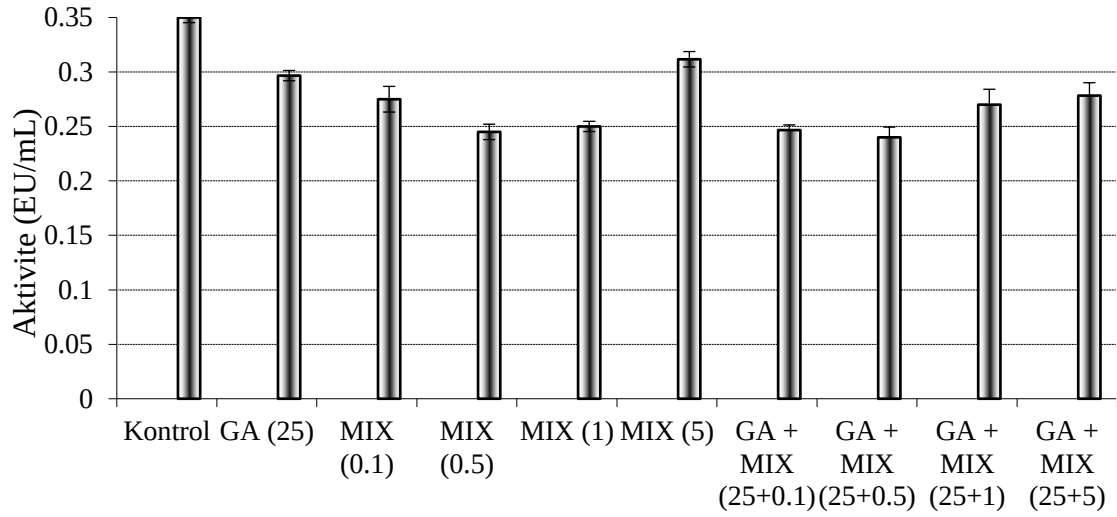
3.3.1. Karbonik Anhidraz hCAI Aktivitesi Bulguları

Akciğer kanseri (A549) hücre hattı üzerinde uygulanan madde, kemoterapi ilacı ve kombinasyon konsantrasyonları hazırlanarak esteraz aktivitesi yöntemi ile hCAI enzimi üzerindeki etkileri belirlendi. 348 nm de 3 dakika boyunca ölçülen absorbans değerlerinden her bir maddenin enzim aktivitesi değerleri EU/mL olarak hesaplandı. Sonuçlar çubuk grafik olarak Şekil 38 ve değerler Tablo 41’de verildi.

Şekillerde ve tablolarda verilen isimler aşağıdaki şekilde kısaltılarak kullanıldı.

Gallik asit: GA, Mitoksantron: MIX, Gallik Asit + Mitoksantron: GA + MIX

Karbonik anhidraz: hCA

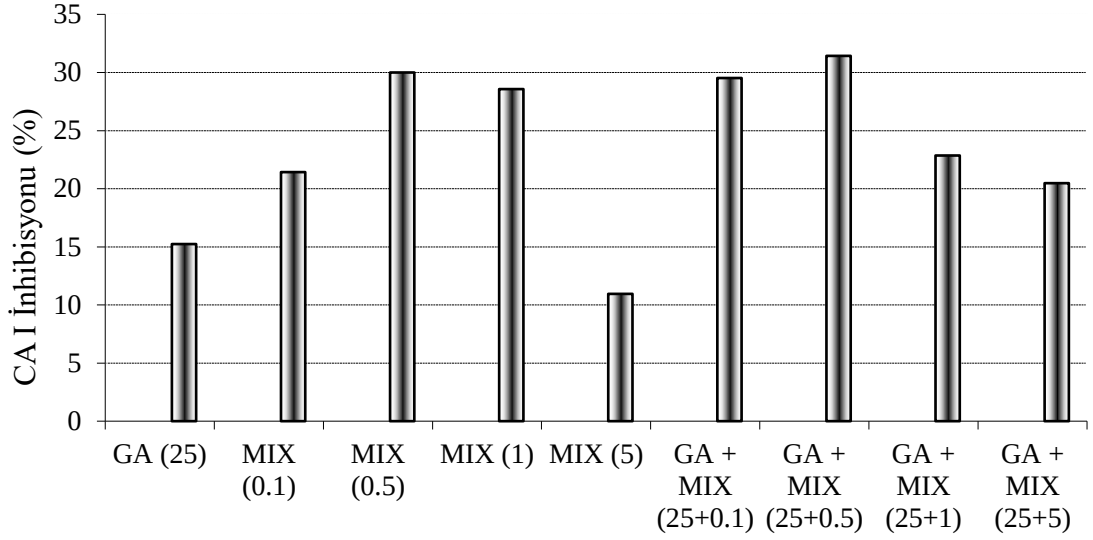


Şekil 38. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAI enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAI enzim aktivite (EU/mL) grafiği

Tablo 41. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAI enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAI enzim aktivite (EU/mL) ve standart sapma değerleri

Madde ve Kombinasyonlar	CAI aktivitesi EU /mL	Standart sapma
Kontrol (hCAI)	0.350	0.005
GA (25 μ M)	0.297	0.005
MIX (0.1 μ M)	0.275	0.012
MIX (0.5 μ M)	0.245	0.007
MIX (1 μ M)	0.250	0.005
MIX (5 μ M)	0.312	0.007
GA + MIX (25 + 0.1 μ M)	0.247	0.005
GA + MIX (25 + 0.5 μ M)	0.240	0.009
GA + MIX (25 + 1 μ M)	0.270	0.014
GA + MIX (25 + 5 μ M)	0.278	0.012

Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAI enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri % inhibisyon değerleri hesaplanarak belirlendi (Şekil 39 ve Tablo 42)



Şekil 39. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit ve Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAI enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla çizilen inhibisyon (%) grafiği

Tablo 42. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAI enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla hesaplanan inhibisyon değerleri (%)

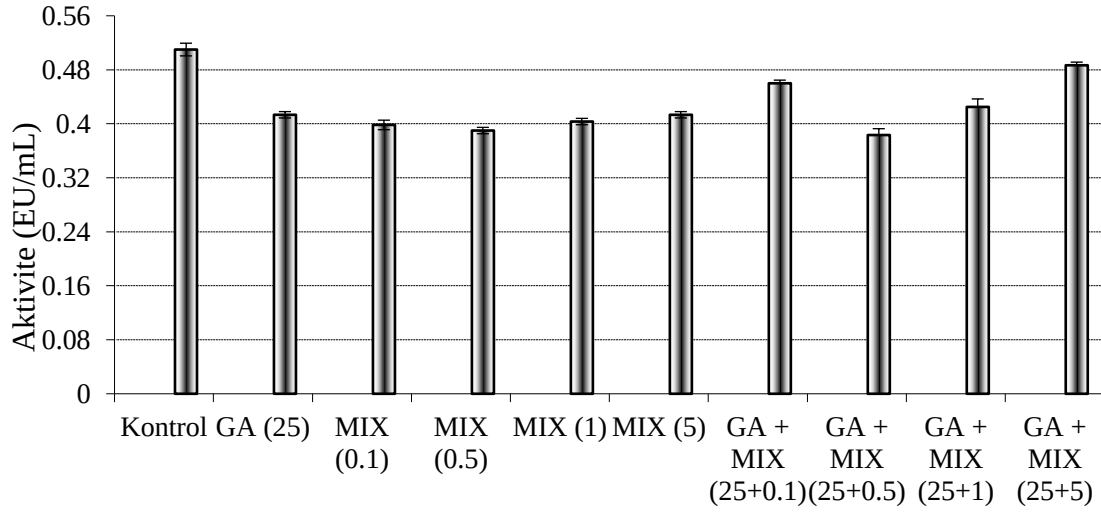
hCAI İnhibisyonu (%)		
GA (25 μ M)	MIX (0.1 μ M)	GA + MIX (25+0.1 μ M)
15.238	21.429	29.524
GA (25 μ M)	MIX (0.5 μ M)	GA + MIX (25+0.5 μ M)
15.238	30.000	31.429
GA (25 μ M)	MIX (1 μ M)	GA + MIX (25+1 μ M)
15.238	28.571	22.857
GA (25 μ M)	MIX (5 μ M)	GA + MIX (25+5 μ M)
15.238	10.952	20.476

Tablo 41’de verilen enzim aktivitesi değerlerinden hesaplanan ve Tablo 42’de verilen inhibisyon sonuçlarına göre akciğer (A549) hücre hattı üzerinde uygulanan kombinasyonların hem Gallik asit hem Mitoksantron inhibisyon değerinin üzerine çıkan en etkin inhibisyon değerini (% 31.429) veren Gallik asit + Mitoksantron kombinasyon konsantrasyonunun (25 + 0.5 μ M) olduğu gözlemlendi.

3.3.2. Karbonik Anhidraz hCAII Aktivitesi Bulguları

Akciğer kanseri (A549) hücre hattı üzerinde uygulanan madde, kemoterapi ilacı ve kombinasyon konsantrasyonları hazırlanarak esteraz aktivitesi yöntemi ile hCAII enzimi üzerindeki etkileri belirlendi. 348 nm de 3 dakika boyunca ölçülen absorbands

değerlerinden her bir maddenin enzim aktivitesi değerleri EU/mL olarak hesaplandı sonuçlar çubuk grafik olarak Şekil 40 ve değerler Tablo 43'te verildi.

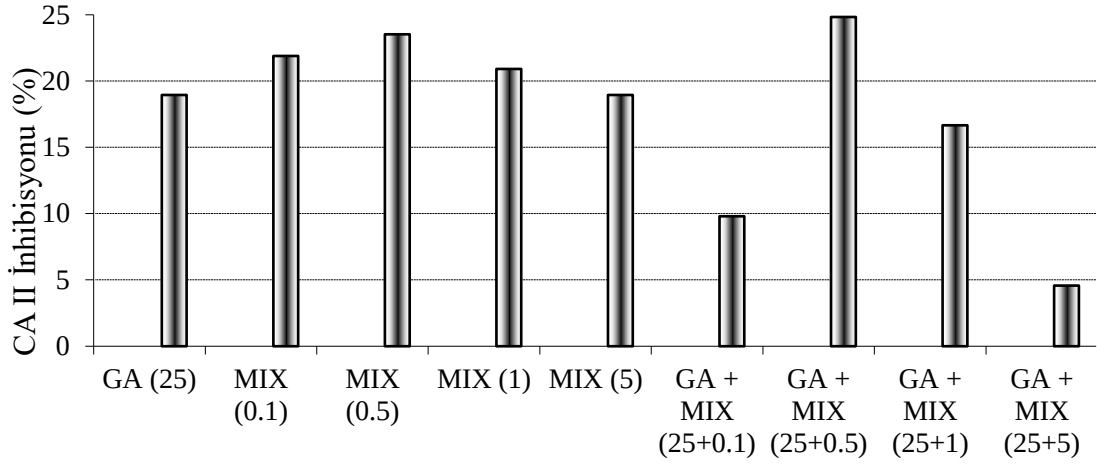


Şekil 40. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAII enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAII enzim aktivite (EU/mL) grafiği

Tablo 43. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAII enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAII enzim aktivite (EU/mL) ve standart sapma değerleri

Madde ve Kombinasyonlar	CAII aktivitesi EU /mL	Standart sapma
Kontrol (hCAII)	0.510	0.009
GA (25 μ M)	0.413	0.005
MIX (0.1 μ M)	0.398	0.007
MIX (0.5 μ M)	0.390	0.005
MIX (1 μ M)	0.403	0.005
MIX (5 μ M)	0.413	0.005
GA + MIX (25 + 0,1 μ M)	0.460	0.005
GA + MIX (25 + 0.5 μ M)	0.383	0.009
GA + MIX (25 + 1 μ M)	0.425	0.012
GA + MIX (25 + 5 μ M)	0.487	0.005

Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAI enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri % inhibisyon değerleri hesaplanarak belirlendi (Şekil 41 ve Tablo 44).



Şekil 41. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit ve Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAII enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla çizilen inhibisyon (%) grafiği

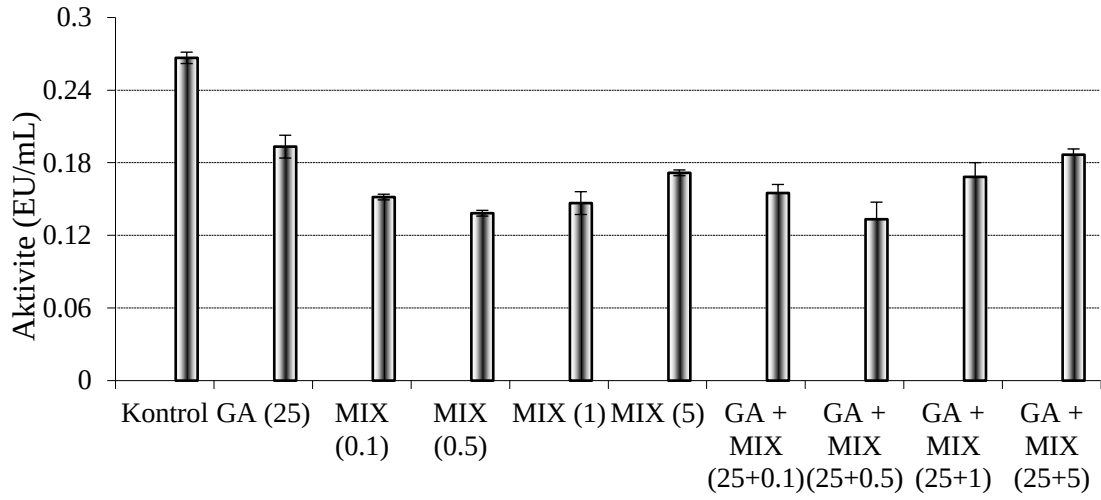
Tablo 44. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAII enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla hesaplanan inhibisyon değerleri (%)

hCAII İnhibisyonu (%)		
GA (25 μ M)	MIX (0.1 μ M)	GA + MIX (25 + 0.1 μ M)
18.954	21.895	9.804
GA (25 μ M)	MIX (0.5 μ M)	GA + MIX (25 + 0.5 μ M)
18.954	23.529	24.837
GA (25 μ M)	MIX (1 μ M)	GA + MIX (25 + 1 μ M)
18.954	20.915	16.667
GA (25 μ M)	MIX (5 μ M)	GA + MIX (25 + 5 μ M)
18.954	18.954	4.575

Tablo 43'te verilen enzim aktivitesi değerlerinden hesaplanan ve Tablo 44'te verilen inhibisyon sonuçlarına göre akciğer (A549) hücre hattı üzerinde uygulanan kombinasyonların hem Gallik asit hem Mitoksantron inhibisyon değerinin üzerine çıkan en etkin inhibisyon değerini (% 24.837) veren Gallik asit + Mitoksantron kombinasyon konsantrasyonunun (25 + 0.5 μ M) olduğu gözlemlendi.

3.3.2. Karbonik Anhidraz hCAIX aktivitesi bulguları

Akciğer kanseri (A549) hücre hattı üzerinde uygulanan madde, kemoterapi ilacı ve kombinasyon konsantrasyonları hazırlanarak esteraz aktivitesi yöntemi ile hCAIX enzimi üzerindeki etkileri belirlendi. 348 nm de 3 dakika boyunca ölçülen absorbans değerlerinden her bir maddenin enzim aktivitesi değerleri EU/mL olarak hesaplandı sonuçlar çubuk grafik olarak Şekil 42 ve değerler Tablo 45'te verildi.

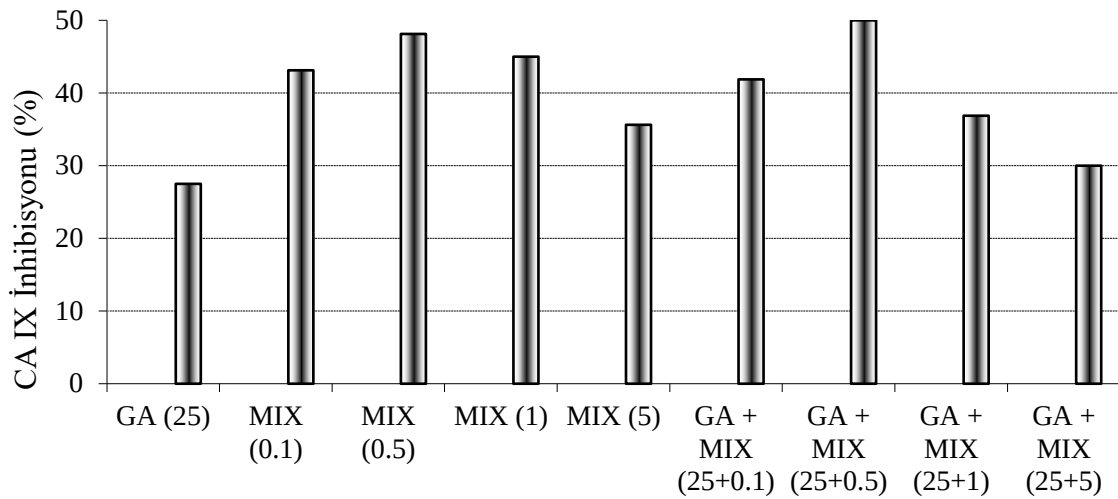


Şekil 42. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAIX enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAIX enzim aktivite (EU/mL) grafiği

Tablo 45. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAIX enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hesaplanan hCAIX enzim aktivite (EU/mL) ve standart sapma değerleri

Madde ve Kombinasyonlar	CAIX aktivitesi EU /mL	Standart sapma
Kontrol (hCAIX)	0.267	0.005
GA (25 μ M)	0.193	0.009
MIX (0.1 μ M)	0.152	0.002
MIX (0.5 μ M)	0.138	0.002
MIX (1 μ M)	0.147	0.009
MIX (5 μ M)	0.172	0.002
GA + MIX (25 + 0.1 μ M)	0.155	0.007
GA + MIX (25 + 0.5 μ M)	0.133	0.014
GA + MIX (25 + 1 μ M)	0.168	0.012
GA + MIX (25 + 5 μ M)	0.487	0.005

Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAIX enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri % inhibisyon değerleri hesaplanarak belirlendi (Şekil 43 ve Tablo 46).



Şekil 43. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit ve Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAIX enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla çizilen inhibisyon (%) grafiği

Tablo 46. Belirli konsantrasyonlardaki Gallik asit (25 μ M), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) ve Gallik asit + Mitoksantron (25 + 0.1, 25 + 0.5, 25 + 1, 25 + 5 μ M) maddelerinin hCAIX enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla hesaplanan inhibisyon değerleri (%)

hCAIX İnhibisyonu (%)		
GA (25 μ M)	MIX (0.1 μ M)	GA + MIX (25 + 0.1 μ M)
27.500	43.125	41.875
GA (25 μ M)	MIX (0.5 μ M)	GA + MIX (25 + 0.5 μ M)
27.500	48.125	50.000
GA (25 μ M)	MIX (1 μ M)	GA + MIX (25 + 1 μ M)
27.500	45.000	36.875
GA (25 μ M)	MIX (5 μ M)	GA + MIX (25 + 5 μ M)
27.500	35.625	30.000

Tablo 45'te verilen enzim aktivitesi değerlerinden hesaplanan ve Tablo 46'da verilen inhibisyon sonuçlarına göre akciğer (A549) hücre hattı üzerinde uygulanan kombinasyonların hem Gallik asit hem Mitoksantron inhibisyon değerinin üzerine çıkan en etkin inhibisyon değerini (% 50.000) veren Gallik asit + Mitoksantron kombinasyon konsantrasyonunun (25 + 0.5 μ M) olduğu gözlemlendi.

4. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında akciğer kanser hücresinde (A549) ve farklı kanser türlerinde sıklıkla kullanılan Dosetaksel ve Mitoksantron kemoterapi ilaçlarının Gallik asit ile birlikte farklı konsantrasyonlarda kullanım sonucu etkinlikleri araştırılmıştır. Sinerjik etki görünen kombinasyon konsantrasyonları seçilerek apoptoz testi uygulanmıştır. A549 ve kombinasyon uygulanan hücrelerden alınan proteinlerde karbonik anhidraz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Kemoterapi ilacı ve kombinasyonların uygulandığı hücre hatlarında antioksidan enzim (CAT, GST, SOD ve GR) aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca, Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonların antioksidan aktiviteleri ABTS· giderme, DPPH· giderme, DMPD· giderme, Fe^{3+} - Fe^{+2} indirgenme, Fe^{3+} - Fe^{+2} indirgenme (FRAP) ve Cu^{2+} - Cu^{1+} indirgenme tayin yöntemleri kullanılarak, inhibisyon etkileri ise karbonik anhidraz I, II ve IX enzimleri üzerindeki etkileri incelenerek belirlenmiştir.

İnsan akciğer kanser hücre hattında (A549) hücre proliferasyon (XTT testi) testi yapılmış ve inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Gallik asidin antikarsinojenik etkisinden dolayı tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki yaptığı bilinmektedir (Gokcen vd., 2016). Gallik asidin 25µM-150µM konsantrasyon aralığındaki inhibisyon değerleri % 55.07–88.57 olarak tespit edilmiştir. Park ve Kım (2013) yılında yaptıkları çalışmada, 100 µM Gallik asit ile tedavi edilen A549 hücrelerinin 24 saat sonra hücre büyümesini % 40 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Park ve Kım, 2013). Çalışmamızda ise 100 µM Gallik asit hücrelerin büyümesini % 64.41 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir.

XTT inhibisyon çalışmasında kemoterapi ilacı olan Mitoksantronun 0.1 µM-10 µM konsantrasyon aralığındaki inhibisyon değerleri % 41.88–81.37 olarak bulunmuştur. Falvo vd. (2018) yılında yaptıkları çalışmada, Mitoksantronun farklı pankreatik hücre hatlarında etkisini incelemişlerdir. Bu pankreatik kanser hücre hatlarında PaCa44'ün % 50 inhibisyon dozu 0.43 µM, Capan-1'in ise 0.72 µM olarak tespit etmişlerdir (Falvo vd., 2018). Carlisi vd. (2017) yılında yaptıkları çalışmada, Mitoksantronun MDA-MB231 hücre hattında etkisini incelemişlerdir. MDA-MB231 kanser hücre hattında 24 saat sonunda % 50 inhibisyon dozu 0.7 µM olarak tespit etmişlerdir (Carlisi vd., 2017). Çalışmamızda ise % 50 inhibisyon konsantrasyonu 0.5 µM denk gelmektedir. Diğer bir çalışmada ise Conti vd. (2021) yılında Mitoksantronun pankreatik hücre hattında etkisini incelemişlerdir. Bu pankreatik kanser hücre hattında PaCa44'ün 48 saat

sonunda % 50 inhibisyon dozu 0.47 μM olarak tespit etmişlerdir (Conti vd., 2021). Mitoksantronun birçok farklı kanser türünde kullanılıyor olmasına rağmen literatürde akciğer kanseri üzerine çalışmasına rastlanamamıştır. Bizim elde ettiğimiz değerler farklı kanser türlerinde etki ettiği gibi akciğer kanser türünde de Mitoksantronun başarı sağlayacağı yönündedir. Çalışmamızda kullandığımız diğer bir kemoterapi ilacı ise Dosetaksel'dir. Dosetaksel ile akciğer hücre hattı üzerine yaptığımız çalışmada Dosetakselin 5 μM –50 μM konsantrasyon aralığındaki inhibisyon değerleri % 58.52–65.24 olarak bulunmuştur. Li vd. (2021) yılında yaptıkları çalışmada, akciğer kanser hücre hatlarında (A549) 58.5 μM Dosetakselin 24 saat sonra hücre büyümesini % 50 inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Liv d., 2021). Çalışmamızda ise en yüksek değer olan 50 μM Dosetakselin 24 saat sonunda hücre büyümesini % 65.24 inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda akciğer kanser hücre (A549) hattı üzerinde Gallik asit, Dosetaksel, Mitoksantron, Gallik asit-Dosetaksel ve Gallik asit-Mitoksantron maddelerinin inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Fenolik madde ve ilaç kombinasyonlarının bu maddelerin tek başına kullanılmasına kıyasla daha yüksek inhibisyon etki göstermiştir. En iyi etkiyi Gallik asidin Mitoksantron kemoterapi ilacıyla beraber kullanımında gösterdiği gözlenmiştir. Kombinasyonların en etkin sinerjik etkisini belirlemek amacıyla CompuSyn programı kullanılmış ve CI değerleri hesaplanmıştır. Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonu için en etkin CI değerini 25 μM Gallik asit ve 5 μM Mitoksantron kullanımında göstermesine rağmen yüksek inhibisyon oluşması diğer çalışmaların yapılmasına engel olacağı sebebiyle kombinasyon için kullanılacak konsantrasyon olarak 25 μM Gallik asit ve 0.5 μM Mitoksantron değerleri seçilmiştir. 50 μM 'lık Gallik asidin Mitoksantron kombinasyonunda tutarlı sonuçlar gözlemlenmemiştir. Aynı şekilde Gallik asidin Dosetaksel kombinasyonunda da doza bağlı olarak orantısal değerler elde edilememiştir. Sonuçların CompuSyn programında değerlendirilmesi ile de etkin CI değerleri gözlenememiştir. Benzer bir çalışma olarak Fu vd. (2022), yılında yaptıkları çalışmada, kafeik asit-dosetaksel kombinasyonun prostat kanseri hücrelerinde etkisini incelemişlerdir. Fenolik madde ilaç kombinasyonu hastalarda sağkalımı arttırmıştır. Dosetaksele direnç geliştiren hücrelerin çoğalmasını, hayatta kalmasını ve tümör büyümesini baskılamıştır. Ayrıca prostat kanseri hücrelerinde (PCa) apoptozu indüklemiştir (Fu vd., 2022). Diğer bir çalışmada, Wang vd. (2018) yılında, paklitaksel-honokiol kombinasyonun akciğer kanseri hücrelerinde etkisini incelemişlerdir. Fenolik madde ilaç kombinasyonu hücreler üzerinde sitotoksiteyi arttırmış ve tümör metastazı üzerinde inhibitör etki yapmıştır. Ayrıca

apoptotik enzimler olan kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive etmiştir. Bu sayede antitümör etkinliğini arttırmıştır. Kombinasyondaki fenolik madde olan honokiol oranı arttıkça tümör hücrelerin inhibisyonunda paralel bir şekilde artmıştır (Wang vd., 2018). Bu çalışmalarda görüldüğü gibi fenolik maddelerin kemoterapi ilaçlarıyla beraber kullanılması farklı kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını inhibe etmektedir.

Ayrıca sinerjik etkisi tespit edilen Gallik asit (25 μ M) + Mitoksantron (0.5 μ M) kombinasyonunun kanserli hücreye uygulanması sonucu 24 saat sonunda alınan proteinin konsantrasyonunun (3305.80 μ g/mL), ilaç uygulaması yapılmayan kanser hücresinden alınan protein konsantrasyonunun ise (3319.80 μ g/mL) olduğu görülmüştür. Protein konsantrasyonundaki bir miktar düşüşün olması ve çok azalmaması hücredeki protein yapısındaki enzimlerin aktivitetlerinin ölçülmesi açısından önemlidir.

İnsan akciğer kanser hücre (A549) hatlarında antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi çalışması kapsamında, hücre kültüründe belirlediğimiz etkin kombinasyon konsantrasyonlarında katalaz (CAT), glutatyon s-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon redüktaz (GR) çalışmaları yapılmıştır. Tüm antioksidan enzim çalışmaları hücre apoptozunun tespit edildiği kombinasyon (Gallik asit (25 μ M) + Mitoksantron (0.5 μ M)) konsantrasyonunun A549 hücre hattı üzerine uygulanması ve 24 saat sonunda enzim aktivitelerinin ölçülmesiyle yapılmıştır. CAT enzim aktivitesi hesaplamaları sonucunda CAT değerleri; A549 (kontrol) için 0.0253 EU/mg ve Gallik asit (25 μ M)-Mitoksantron (0.5 μ M) için 0.0243 EU/mg elde edilmiştir. SOD enzim aktivitesi deneyinde, yapılan hesaplamalar sonucunda SOD değerleri; A549 (kontrol) için 7.026 EU/mg ve Gallik asit (25 μ M)-Mitoksantron (0.5 μ M) için 6.719 EU/mg elde edilmiştir. GST enzim aktivitesi için hesaplanan GST değerleri; A549 (kontrol) için 0.00209 EU/mg ve Gallik asit (25 μ M)-Mitoksantron (0.5 μ M) için 0.00180 EU/mg elde edilmiştir. Çalışmamızda GR enzim aktivitesi deneyinde GSH değerleri; A549 (kontrol) için 0.263 μ M/mg ve Gallik asit (25 μ M)-Mitoksantron (0.5 μ M) için 0.239 μ M/mg elde edilmiştir.

Anti-kanser ilaçları çoğunlukla sitotoksiktir ve hücrel oksidatif durumun değişmesinden dolayı çok çeşitli yan etkilerle ilişkilidir. Bu nedenle, hem antioksidanlar hem de prooksidanlar, kanser tedavisinde belirgin avantajlara ve dezavantajlara sahiptir (George ve Abrahamse 2020). Genel olarak akciğer kanseri ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmalarda komşu canlı hücrelere göre kanserli hücrelerde çok değişken sonuçlar gözlenirken akciğer kanserinde SOD, CAT ve GST'nin tanıda önemli olduğu

bildirilmiştir (Cecerska-Hery'c vd., 2021). Örneğin Chung-man Ho vd. (2001) yılında yaptıkları bir çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunun komşu kanserli olmayan dokularına göre tümör dokusunda SOD'un arttığı ve CAT aktivitesinin azaldığı ve GSH ve GPx in pek değişmediğini ve böylece kanserli dokuların teşvikini sağladığı bildirilmiştir (Chung-man Ho vd., 2001). Yine Kaynar vd. (2005) yılında yaptıkları bir çalışmada sağlıklı bir kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının eritrositlerinde artmış SOD aktivitesi gözlemlemiştir (Kaynar vd., 2005). Bu çalışmaların aksine Zalewska-Ziob vd. (2019) yılında sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında, kanser hücrelerinin düşük SOD aktivitesi ve neredeyse her zaman düşük CAT aktivitesi sergilediği GSH ile ilişkili enzim aktivitesi akciğer kanseri dokularında önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Zalewska-Ziob vd., 2019).

Benzer şekilde antioksidanların ilaçlarla birlikte kullanımlarında da literatürde antioksidan enzim aktivitesi ile ilgili olarak çok farklı sonuçlar bulunmaktadır. Bu nedenle, birçok klinisyen antineoplastik kemoterapötik rejim sırasında antioksidanları kullanmak konusunda farklı düşünceleri bulunmaktadır. Bununla birlikte, antioksidanların birçok anti kanser ilacı ile sinerji içinde çalışabileceği durumlar vardır. Kantitatif olarak, bu antioksidanlar, antineoplastik ajanların daha yüksek ve daha uzun süreli alımına izin verecek ve böylece tedavinin etkinliğini artıracaktır. Kanser kemoterapisinin yanı sıra antioksidanların kullanımı üzerine yapılan bir meta analiz, bunların kanser hastalarında sağkalım sürelerinin yanı sıra terapötik potansiyeli de artırdığını göstermektedir (Singh vd., 2018). Genel olarak çalışmada antioksidan enzim sonuçlarında kontrole göre artış gözlemlenmediği ve dolayısıyla ilaca karşı etkin bir direnç gelişmediği ve bu durumunda tümörlü hücre yıkımıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışma *in vivo* olarak tekrarlanırsa bu anlamda daha kesin ifadeler kullanılabilecektir.

Akciğer kanser (A549) hücresi üzerine Gallik asit ve Mitoksantron ilaç kombinasyonunun (25 μ M + 0.5 μ M) uygulanması sonucu ve ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücresinden alınan protein örneklerinde kontrol aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek ilaç kombinasyonu aktivitesi hesaplanmış mevcut spesifik enzim aktivitesi % 91.016 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak 24 saat sonunda ilaç kombinasyonu uygulanan hücreden enzim aktivitesinin % 8.984 oranında düştüğü gözlemlenmiştir. Karbonik anhidrazın kanser hastalığında yükselmesiyle bir biyobelirteç olması durumu düşünüldüğünde hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrası bu düşüş önemlidir. Enzim aktivitesi kontrol değerine göre daha yüksek

seviyelere çıkmamış aksine düşüş göstermiştir. Buda kombinsayonların hücre hattı üzerindeki antikanser etkisinin diğer bir göstergesidir.

Gallik asit, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonların antioksidan aktivitelerini belirlemek amacıyla DPPH[·] giderme, ABTS⁺ giderme, DMPD⁺ giderme, Fe³⁺-Fe²⁺ indirgenme kapasitesi, Fe³⁺-Fe²⁺ (FRAP), Cu²⁺-Cu¹⁺ indirgenme (Kuprak) metotları çalışılmıştır.

Bu çalışma kapsamında, DPPH[·] Giderme metodunda Gallik asit, Mitoksantron, Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetakselin IC₅₀ (µg/mL) değerleri sırasıyla 3.020, 6.556, 5.675 ve 5.957 olarak tespit edilmiştir (Tablo 17). Değerlerden anlaşıldığı üzere Gallik asit–Mitoksantron kombinasyon değerleri tek başına kullanılan ilaca göre daha etkindir ve IC₅₀ değerinde düşme gözlemlenmiştir. Rajeshkumar vd. (2018) yılında yaptıkları çalışmada, Akciğer kanser hücre (A549) hatlarında askorbik asit, çinko oksit ve *Mangifera indica* (mango)’nun DPPH[·] giderme aktivitesini ölçmüşlerdir. Yaptıkları deneme sonucunda askorbik asit, çinko oksit ve *Mangifera indica* (mango)’nun % 50 inhibisyon değerini yaklaşık 20-30 µg/mL aralığında saptamışlardır (Rajeshkumar vd., 2018). Çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerde Gallik asit, Mitoksantron ve Gallik asit–Mitoksantron kombinasyonun daha düşük konsantrasyonlarda daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

ABTS⁺ giderme metodunda Gallik asit, Mitoksantron, Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetakselin IC₅₀ (µg/mL) değerleri sırasıyla 0.322, 2.451, 1.323 ve 3.133 olarak tespit edildi (Tablo 18). Değerlerden anlaşıldığı üzere Gallik asit–Mitoksantron kombinasyon değerleri tek başına kullanılan ilaca göre daha etkindir ve IC₅₀ değerinde düşme gözlemlenmiştir. Shah vd. (2019)’da yaptıkları çalışmada, Akciğer kanser hücre hatlarında askorbik asidin ABTS⁺ giderme etkisini ölçmüşlerdir. Yaptıkları deneme sonucunda askorbik asidin 7 mM’lık ABTS⁺ çözeltisinde IC₅₀ değerini yaklaşık 22 µg/mL saptamışlardır (Shah vd., 2019). Çalışmamızda ise Gallik asit ve Gallik asit–Mitoksantron kombinasyonun 3 mM’lık ABTS⁺ çözeltisinde IC₅₀ değerleri 0.322 µg/mL ve 1.323 µg/mL tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda daha düşük konsantrasyonlarda daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Gallik asit ve kombinasyonları için DMPD⁺ giderme aktivitesi IC₅₀ değerleri belirlenmiş olup Dosetaksel ve Mitoksantron için düzenli bir artış gözlemlenmemiştir. Gallik asidin tek başına iyi bir DMPD⁺ radikal giderme aktivitesi gözlemlenmiş ancak kombinasyonlarda elde edilen IC₅₀ değerleri çok daha yüksek IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. Gallik asit, Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetaksel IC₅₀ sırasıyla 1.967, 15.935 ve

8.036 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (Tablo 19). Bu durumda kombinasyon için etkin bir DMPD^+ radikal giderme aktivitesi gözlenememiştir.

$\text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{2+}$ ve $\text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{2+}$ (FRAP) indirgenme kapasitesi metotlarında Gallik asit, Mitoksantron, Gallik asit + Mitoksantron ve Gallik asit + Dosetakselin absorbans değerleri ölçülmüştür (Tablo 20 ve 21). Gallik asit –Mitoksantron kombinasyonunda tek başına alınan ölçümlere kıyasla Gallik asitten düşük Mitoksantronla benzer absorbans değerleri ölçülmüştür. Ayrıca Afshari vd. (2022) yılında yaptıkları çalışmada, İnsan akciğer kanser hücre (A549) hatlarında dereotunun $\text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{2+}$ (FRAP) deneyi yaparak antioksidan kapasitesini ölçmüştür. Elde ettikleri sonuçta konsantrasyona göre absorbans artmıştır. Dereotu da aynı şekilde Gallik asit gibi yüksek indirgeme özelliği göstermiştir (Afshari vd., 2022). Çalışmamızda $\text{Cu}^{2+}\text{-Cu}^{1+}$ indirgeme kapasitesi sonuçlarında ise Dosetaksel ve Mitoksantronun konsantrasyon artışına bağlı olarak absorbans artışı daha düşük olup diğer tüm maddeler ve kombinasyonları için konsantrasyon ile birlikte absorbans artışı gözlenmektedir (Tablo 22). Hücre dışında yapılan bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde kombinasyonların sonuçlarının Gallik asitten düşük kemoterapi ilaçlarıyla benzer veya biraz üzerinde olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçların hem antioksidan enzim sonuçlarını hemde hücre apoptoz sonuçlarını destekleyici yönde olduğu görülmektedir.

Tez kapsamında son olarak hücre kültüründe apoptoz için kullanılan Gallik asit (25 μM), Mitoksantron (0.1, 0.5, 1, 5 μM) ve kombinasyonlarını hazırlanarak (25:0.1, 25:0.5, 25:1, 25:5 μM), CAI, CAII ve CAIX enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

hCAI enzimi üzerinde yapılan çalışmada Gallik asit-Mitoksantron (25 + 0.5 μM) kombinasyonunun inhibisyon değerinin (% 31.429) Gallik asit ve Mitoksantrona kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (Gallik asit (25 μM); % 15.238, Mitoksantron (0.5 μM); % 30.0). Yine aynı konsantrasyondaki kombinasyonunun CAII ve CAIX inhibisyon değerlerinin (hCAII: % 24.837, hCAIX: % 50) Gallik asit ve Mitoksantrona kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (hCAII: Gallik asit (25 μM); % 18.954, Mitoksantron (0.5 μM); % 23.529 ve hCAIX: Gallik asit (25 μM); % 27.500, Mitoksantron (0.5 μM); % 48.125).

Kombinasyonlarla ilgili karbonik anhidraz enzim aktivitesi çalışmaları bulunamadığından doğal maddeler ve farklı kombinasyon çalışmaları ile ilgili sonuçlar ayrıca incelenmiştir. Şentürk vd. (2011) resveratrol, kateşin, silimarin, dobutamin ve kurkumin gibi maddelerin karbonik anhidraz I enzimi üzerindeki etkilerini incelemişler ve yaptıkları çalışmada, resveratrol, kateşin, silimarin, dobutamin ve kurkuminin IC_{50}

değerini sırasıyla 2.25 μ M, 4.29 μ M, 4.62 μ M, 5.34 μ M ve 5.63 μ M olarak tespit etmişlerdir (Şentürk vd., 2011). Aygun vd. (2016) yılında yaptıkları çalışmada bal, probolis ve polenin içinde bulunan fenoliklerin (gallik asit, krisin, kateşin ve tannik asit) insan karbonik anhidraz I ve II'ye karşı inhibitör etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, Gallik asidin karbonik anhidraz II enzimi için IC₅₀ değerini 250 μ M olarak tespit etmişlerdir (Aygun vd., 2016). Yapılan başka bir çalışmada yine bazı fenolik asitlerin hCAI ve hCAII enzimleri üzerindeki etkileri araştırılmış Gallik asidin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.17 ve 0.16 μ M olarak bulunmuştur (Öztürk Sarıkaya vd., 2010).

Karbonik anhidraz IX enziminin inhibisyonu küçük hücreli akciğer kanserinde hücre apoptozunu arttırıcı ve tümör büyümesini önemli ölçüde engelleyici etkisi olduğu bilinmektedir (Bryant vd., 2018). Ansari vd. (2018) yılında 20 farklı Piridintiazolidinon türevinin CAIX enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerini araştırmışlar ve IC₅₀ değerlerini 1.61-63.11 μ M aralığında tespit etmişlerdir. Ayrıca Doksorubisin için HEK-293, MCF-7 ve HepG-2 hücre hatları için IC₅₀ değerini sırasıyla 148.4 μ M, 18.5 μ M ve 21.2 μ M olarak saptamışlardır (Ansari vd., 2018). Bazı doğal polifenol ve fenolik asitlerin CAI-XIV enzimleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Gallik asidin CAIX enzimi üzerindeki etkisi belirlenerek sonuç ki değeri (8.20 μ M) olarak verilmiştir (Innocenti vd., 2010).

Gallik asidin CAI, II ve IX enzimleri dışında, CAIII, IV, VA, VB, VI, VII, XII, XIII ve XIV enzimleri içinde inhibisyon etkileri mevcut olduğu çalışmalardan bilinmektedir (Innocenti vd., 2010). Ancak Gallik asit ve kemoterapi ilaçlarının birlikte çalışıldığı karbonik anhidraz enzimi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılan literatür bilgisine rastlanmadığından sonuçlar kendi arasında değerlendirilmiştir. Çalışmada maddelerin hepsinin hCAI, II ve IX enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri görülmüştür. Yine tüm elde edilen sonuçlar incelendiğinde belirli bir konsantrasyonun üstüne çıkıldıkça inhibisyon değerinde düşüş gözlemlenmiştir. hCAI, II ve IX izoenzimleri üzerinde Gallik asit-Mitoksantron (25 + 0.5 μ M) kombinasyonunun hem Gallik asit hemde mitoksantrondan daha yüksek inhibisyon değerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu konsantrasyon hücre hattında da çalışılan en etkin konsantrasyon olduğu gözlemlenmiştir.

Karbonik anhidraz enzim inhibitörleri nörolojik bozukluklar, osteoporoz, glokom, epilepsi, mide ve duodenal ülserin önlenmesinde ya da tedavi edilmesinde oldukça önemlidir (Öztürk Sarıkaya vd., 2011). Ayrıca, CAI, CAII ve CAIX inhibisyonunun antikanser aktivitesi açısından önemli olduğu günümüzde bilinmekte ve bu konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. En etkin kombinasyon dozajında izoenzimler

üzerinde gözlenen inhibisyon değerleriyle özellikle CAIX üzerinde daha yüksek inhibisyon etkisinin gözlemlenmesiyle antikanser aktivite ile karbonik anhidraz inhibisyonu arasında yukarıda anlatılan şekliyle bağlantı kurulabileceğini göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında Gallik asidin hem Mitoksantron hem de Dosataksel ile kombinasyonlarının A549 hücre hattı üzerindeki *in vitro* kanser etkileri incelenmiştir. Dosataksel ile ilgili olan kombinasyonlarda sinerjik etki gözlenememiş olup, Gallik asit ve Mitoksantron ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarının A549 hücre hattı üzerinde sinerjik etkiye sahip oldukları görülmüştür.

Bu kapsamda yapılan hücre çalışmalarında; Gallik asit, Mitoksantron ve Dosataksel'in tek başlarına A549 hücre hattına uygulanmasıyla; her biri için artan konsantrasyonlarda akciğer kanser hücrelerini inhibe etme oranı orantısız olarak arttığı gözlemlenmiştir. Gallik asidin Dosetaksel ile kombinasyon çalışmasında doza bağlı orantısız inhibisyon görülmezken % inhibisyon oranının 40.75-52.92 aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Ancak CompuSyn programında kombinasyonlar için $CI < 1$ olan bir doz bulunamadığından Dosataksel ile ilgili olan kombinasyonlarda sinerjik etki elde edilememiştir. Gallik asidin Mitoksantron ile kombinasyon çalışmasında doza bağlı inhibisyon elde edilmiştir. % inhibisyon oranının 54.38-83.86 aralığında olduğu gözlemlenmiştir. 25 μ M kullanılan Gallik asit kombinasyonlarının 4 dozu için, 50 μ M kullanılan kombinasyonların 2 dozu için $CI < 1$ olarak bulunmuştur. Bu dozlarda kombinasyon için en etkin dozun $CI: 0.00523$ değeriyle 25 μ M + 0.5 μ M olduğu gözlemlenmiştir. Böylece Gallik asit ve Mitoksantron ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonların A549 hücre hattı üzerinde sinerjik etkiye sahip oldukları görülmüştür. En etkin kombinasyon konsantrasyonu uygulanmasıyla hücrenin % 87.10 canlılık oranını 24 saat sonunda önemli derecede azaltarak (% 15.85) hücre apoptozunun sağlandığı görülmektedir. Ayrıca kanser hücrelerine göre en etkin dozun uygulandığı hücreden alınan örnekte protein miktarında çok fazla düşüş olmaması (Kontrol: 3319.80, Gallik asit + Mitoksantron: 3305.80 μ g/mL) enzim aktivitelerinin ölçülebilmesi açısından anlamlı bulunmuştur. Hücreden alınan protein örneklerinde karbonik anhidraz enzim aktivitesinin kontrol hücrelerine oranla % 8.984 düşük çıkması da karbonik anhidraz enziminin yüksek değerlerinin hücrelerde biyobelirteç olarak bilinmesi nedeniyle hücrede antikanser etkisinin gözlemlenmesine destek verici bir anlam taşımaktadır. Gallik asit + Mitoksantron (25 μ M + 0.5 μ M) kombinasyonunun A549 hücre hattı üzerinde antikanser etkisinin belirlenmesi ile birlikte aynı zamanda antiosidan CAT, SOD, GST ve GR araştırılmıştır. CAT, SOD, GST ve GR enzimlerin etkinliği genel olarak değerlendirildiğinde fenolik madde ilaç kombinasyonun

uygulandığı hücrelerde spesifik aktivitelerin kontrolden daha düşük çıkması nedeniyle hücre savunma hattı oluşturmadiğından apoptozu indüklediğini düşündürmüştür. Çalışma kapsamında hücre uygulamaları dışında hazırlanan Gallik asit, Mitoksantron, Dosetaksel kemoterapi ilaçları ve kombinasyonların antioksidan ve antiradikal özellikleri DPPH[•], ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} giderme aktivitesi, Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgeme, FRAP metoduna göre Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme ve Cu²⁺-Cu¹⁺ indirgeme aktivitesi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Kombinasyon sonuçlarının genel olarak Gallik asitten düşük, kemoterapi ilaçlarıyla benzer veya biraz üzerinde bulunmuş olması aynı zamanda antioksidan enzim sonuçlarını ve hücre apoptoz sonuçlarını da destekleyici yönde olduğunu göstermektedir.

Son olarak ise apoptoz analizi için hazırlanan madde konsantrasyonları kullanılarak Gallik asit (25 µM), Mitoksantron (0.5 µM) ve kombinasyonun CAI, II ve IX enzimleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. CAI, II ve IX enzimleri üzerinde kombinasyonların hem Gallik asit, hem de Mitoksantrona göre daha fazla inhibisyon etkisi oluşturduğu gözlemlenmiştir. (CAI: % 31.429, CAII, % 24.837 ve CAIX: % 50.0). Karbonik anhidraz enzimlerinin inhibitörlerinin bazı hastalıkların tedavisinde etken maddeler olarak kullanıldığı göz önüne alındığında elde edilen sonuçlar bu açıdan da oldukça önemlidir.

Sonuç olarak Dosetakselin Gallik asit ile belirlenen kombinasyon konsantrasyonlarında bazı çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen hücre çalışmalarında sinerjik etki gözlemlenemediğinden akciğer kanseri tedavisi için uygun olmadığı kanaatine varılmıştır. Gallik asidin ve Mitoksantronun beraber kullanımında sinerjik etki gözlemlendiği, apoptozu önemli ölçüde indüklediği ve diğer elde edilen sonuçlarında yukarıda anlatıldığı üzere bu durumu destekleyici yönde olduğu görülmüştür. Yukarıda verilen bütün sonuçlar değerlendirilerek Gallik asit ve Mitoksantron kombinasyonunun (25 µM + 0.5 µM) akciğer kanseri tedavisi için uygun olabileceği kanaatine varılmıştır. Çalışma akciğer kanseri üzerinde fenolik bir madde olan Gallik asidin kemoterapi ilaçlarıyla beraber kullanımını ve kemoterapi ilaçlarına göre daha fazla fayda oluşturan etkileri olduğunu destekler nitelikte olup literatüre farklı bir bakış açısı sunmaktadır. Bazı yorumların daha net değerlendirilmesi açısından çalışmanın *in vivo* olarak tekrarlanması önerilen bir durumdur.

KAYNAKÇA

- Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., Pierzchala, K., Polaniak, R. ve Labuz-Roszak, B. (2012). Antioxidant enzymes activity and malondialdehyde concentration during mitoxantrone therapy in multiple sclerosis patients. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 63, 6, 683-690.
- Afshari, H. S. T., Tabrizi, M. H., Ardalan, T., Anoushirvani, N. J. ve Mahdizadeh, R. (2022). *Anethum graveolens* essential oil nanoemulsions (ageo-ne) as an exclusive apoptotic inducer in human lung adenocarcinoma (A549) cells. *Nutrition and Cancer*, 74, 4, 1411-1419.
- Aggarwal, M., Kondeti, B. ve McKenna, R. (2013). Insights towards sulfonamide drug specificity in α -carbonic anhydrases. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 21,6, 1526-1533.
- Agunloye, O. M., Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Ademosun, A. O., Akindahunsi, A. A., Oyagbemi, A. A., . . . Adedapo, A. A. (2018). Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 450–458.
- Al-Aamri, H. M., Ku, H., Irving, H. R., Tucci, J., Meehan-Andrews, T. ve Bradley, C. (2019). Time dependent response of daunorubicin on cytotoxicity, cell cycle and DNA repair in acute lymphoblastic leukaemia. *BMC Cancer*, 19, 179.
- Al-Otaibi, J. S., Wasli, Y. ve ElGogary, T. M. (2018). Theoretical and experimental studies on anticancer drug mitoxantrone. *Journal of Molecular Structure*, 1173, 837e84.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T. ve De Simone, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms. *Chemical Reviews*, 112, 8, 4421-4468.
- Anai, S., Ibusuki, R., Takao, T., Sakuri, Y., Hisasue, J. ve Takaki, Y. (2019). Retrospective cohort study on the safety and efficacy of docetaxel in Japanese non-small cell lung cancer patients with nondialysis chronic kidney disease stage 3b or higher. *Thoracic Cancer*, 1759-7706.
- Ansari, M. F., Idrees, D., Hassan, I., Ahmad, K., Avecilla, F. ve Azam, A. (2018). Design, synthesis and biological evaluation of novel pyridine-thiazolidinone

- derivatives as anticancer agents: Targeting human carbonic anhydrase IX. *European Journal of Medicine Chemistry*, 144, 544-556.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Erça, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 292–304.
- Asano, T., Matsuzaki, H., Iwata, B., Xuan, M., Kamiuchi, S., Hibino, Y. ve Okazaki, M. (2017). Protective effects of ferulic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced swallowing dysfunction in rats. *International Journal Molecular Sciences*, 18, 550.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., . . . Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü–süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon Peroksidaz (GPx). *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26, 3, 362-369.
- Aygul, I., Yaylaci Karahalil, F. ve Supuran, C. T. (2016). Investigation of the inhibitory properties of some phenolic standards and bee products against human carbonic anhydrase I and II. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 4, 119-124.
- Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P. ve Menon, V. P. (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 18, 310–314.
- Bami, E., Ozakpinar, O. B., Ozdemir-Kumral, Z. N., Köroğlu, K., Ercan, F., Cirakli, Z., . . . Okuyan, B. (2017). Protective effect of ferulic acid on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 54, 105–111.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199- 1200.
- Bouzaïene, N. N., Jaziri, S. K., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K. ve Luis, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*, 766, 99–105.
- Bryant, J. L., Gieling, R. G., Meredith, S. L., Allen, T. J., Walker, L., Telfer, B. A., . . . White, A. (2018). Novel carbonic anhydrase IX-targeted therapy enhances the anti-tumor effects of cisplatin in small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 142, 191-201.

- Capelo, T., Benyahia, Z., Zampieri, L. X., Blackman, M. C. N. M. ve Sonveaux, P. (2020). Metabolic and non-metabolic pathways that control cancer resistance to anthracyclines. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 98, 181-191.
- Carlisi, D., De Blasio, A., Drago-Ferrante, R., Di Fiore, R., Buttitta, G., Morreale, M., . . . Tesoriere, G. (2017). Parthenolide prevents resistance of MDA-MB231 cells to doxorubicin and mitoxantrone: The role of nrf2. *Cell Death Discovery*, 3, 17078.
- Carocho, M ve Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Cecerska-Hery'c, E., Surowska, O., Hery'c, R., Serwin, N., Napiontek-Bali'nska, S. ve Dołęgowska, B. (2021). Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients, *Clinical Biochemistry*, 93, 1–8.
- Cemeroğlu, B. (2009). Meyve ve sebze işleme teknolojisi 1. Cilt. Ankara, Türkiye: Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 38, 77-88.
- Chang, A. (2011). Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer*, 71, 3-10.
- Chang, Y. C., Fong, Y., Tsai, E. M., Chang, Y. G., Chou, H. L., Wu, C. Y., . . . Chiu, C. C. (2018). Exogenous C₈-ceramide induced apoptosis by overproduction of ROS and the switch of superoxide dismutases SOD1 to SOD2 in human lung cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3010.
- Cheng, W. J., Zhang, P. P., Luo, Q. Q., Deng, S. M. ve Jia, A. Q. (2020). The chemosensitizer ferulic acid enhances epirubicin-induced apoptosis in MDA-MB-231 cell. *Journal of Functional Foods*, 73, 104130.
- Chew, L ve Chuen, V. S. L. (2009). Cutaneous reaction associated with weekly docetaxel administration. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 15, 29-34.
- Chiang, W. L., Chu, S. C., Yang, S. S., Li, M. C., Lai, J. C., Yang, S. F., . . . Hsieh, Y. S. (2002). The aberrant expression of cytosolic carbonic anhydrase and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 188, 199-205.
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, 70, 2, 440-446.
- Chung-man, H. J., Zheng, S., Comhair, S. A., Farver, C. ve Erzurum, S. C. (2001). Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Research*, 61, 23, 8578–8585.

- Conti, G., Pitea, M., Ossanna, R., Opri, R., Tisci, G., Falvo, E., . . . Fracasso, G. (2021). Mitoxantrone-loaded nanoferritin slows tumor growth and improves the overall survival rate in a subcutaneous pancreatic cancer mouse model. *Biomedicines*, 9, 1622.
- Çoban, Ç., Temel, Y. ve Çiftçi, M. (2022). Koyun dalak dokusundan saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve glutatyon redüktaz enzimi üzerine diklofenak sodyumun *in vitro* etkileri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12, 3, 1624-1634.
- Datta, S. ve Sinha, D. (2021). Low dose epigallocatechin-3-gallate revives doxorubicin responsiveness by a redox-sensitive pathway in A549 lung adenocarcinoma cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36, 4.
- Desai, A., Abdayem, P., Adjei, A. A. ve Planchard, D. (2022). Antibody-drug conjugates: A promising novel therapeutic approach in lung cancer. *Lung Cancer*, 163, 96-106.
- Doyen, J., Parks, S. K., Marcié, S., Pouysségur, J. ve Chiche, J. (2013). Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis. *Frontiers in Oncology*, 2, 199.
- Ergün, A. ve Karataş, M. O. (2020). Yeni n-benzilbenzimidazol-gümüş-(I) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu, karbonik anhidraz ve polifenol oksidaz enzimleri üzerindeki inhibitör özellikleri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10, 1, 320-327.
- Falvo, E., Malagrino, F., Arcovito, A., Fazi, F., Colotti, G., Tremante, E., . . . Ceci, P. (2018). The presence of glutamate residues on the PAS sequence of the stimuli-sensitive nano-ferritin improves *in vivo* biodistribution and mitoxantrone encapsulation homogeneity. *Journal of Controlled Release*, 275, 177-185.
- Ferraroni, M., Tilli, S., Briganti, F., Chegwidde, W. R., Supuran, C. T., Wiebauer, K. E., . . . Scozzafava, A. (2002). Crystal structure of a zinc-activated variant of human carbonic anhydrase I, CAI michigan 1: Evidence for a second zinc binding site involving arginine coordination. *Biochemistry*, 41, 20, 6237-44.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. ve Ritene, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040
- Fox, E. J. (2006). Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: A review. *Clinical Therapeutics*, 28, 461-74.

- Fu, Y. K., Wang, B. J., Tseng, J. C., Huang, S. H., Lin, C. Y., Kuo, Y. Y., . . . Chuu, C. P. (2022). Combination treatment of docetaxel with caffeic acid phenethyl ester suppresses the survival and the proliferation of docetaxel-resistant prostate cancer cells via induction of apoptosis and metabolism interference. *Journal of Biomedical Science*, 29, 16.
- Gallego-Yerga, L., Posadas, I., de la Torre, C., Ruiz-Almansa, J., Sansone, F., Mellet, C. O., . . . Ceña, V. (2017). Docetaxel-loaded nanoparticles assembled from B-cyclodextrin/calixarene giant surfactants: Physicochemical properties and cytotoxic effect in prostate cancer and glioblastoma cells. *Frontiers Pharmacol*, 8, 249.
- Gao, B. B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S. J., Srinivasan, V. J., Wojtkowski, M., . . . Feener, E.P. (2007). Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nature Medicine*, 13, 2, 181-188.
- Gao, J., Hu, J., Hu, D. ve Yang, X. (2019). A role of gallic acid in oxidative damage diseases: A comprehensive review. *Natural Product Communications*, 1, 9.
- Georgean, S. ve Abrahamse, H. (2020). Redox potential of antioxidants in cancer progression and prevention. *Antioxidants*, 9, 1156.
- Gholamine, B., Houshmand, G., Hosseinzadeh, A., Kalantar, M., Mehrzadi, S. ve Goudarzi, M. (2021). Gallic acid ameliorates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 44, 4, 341-352.
- Gokcen, T., Gulcin, I., Ozturk, T. ve Goren, A. C. (2016). A class of sulfonamides as carbonic anhydrase I and II inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31,2, 180-188.
- Gorini, S., De Angelis, A., Berrino, L., Malara, N., Rosano, G. ve Ferraro, E. (2018). Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: Focus on doxorubicin, trastuzumab, and sunitinib. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 15.
- Gullner, G., Komives, T., Kiraly, L. ve Schröder, P. (2018). Glutathione s-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1836.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidants activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Hanahan, D ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 5, 646-674.

- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P. ve Ferreira, C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids, metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513.
- Hynninen, P., Parkkila, S., Huhtala, H., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., . . . Tomas, E. (2012). Carbonic anhydrase isozymes II, IX, and XII in uterine tumors. *APMIS*, 120, 2, 117-129.
- Innocenti, A., Hilvo, M., Scozzafava, A., Parkkila, ve S., Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the new membrane-associated isoform XV with phenols. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 18, 12, 3593-6.
- Innocenti, A., Öztürk Sarıkaya, S. B., Gülçin, I. ve Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I–XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 2159-2164.
- Jang, Y. G., Ko, E. B. ve Choi, K. C. (2020). Gallic acid, a phenolic acid, hinders the progression of prostate cancer by inhibition of histone deacetylase 1 and 2 expression. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 84, 108444.
- Kallio, H., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W. S., Mannisto, S., . . . Parkkila, S. (2006). Expression of carbonic anhydrases IX and XII during mouse embryonic development. *BMC Developmental Biology*, 26, 22.
- Karimpour, M., Rawanbakhsh, R., Maydanchi, M., Rajabi, A., Azizi, F. ve Saber, A. (2021). Cancer driver gene and non-coding RNA alterations as biomarkers of brain metastasis in lung cancer: A review of the literature. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112190.
- Kaya, A. A., Şentürk, M. ve Kaya, E. Ç. (2019). Nitro grubu içeren bazı maddelerin glutatyon redüktaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8, 4, 438-443.
- Kaynar, H., Meral, M., Turhan, H., Keles, M., Celik, G. ve Akcay, F. (2005). Glutathione peroxidase, glutathione-s-transferase, catalase, xanthine oxidase, cu-zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Letter*, 227, 2, 133–139.
- Khorsandi, K., Kianmehr, Z., Hosseiniardi, Z. ve Hosseinzadeh, R. (2020). Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS

- production and induction of apoptosis and ferroptosis. *Cancer Cell International*, 20, 18.
- Kumar, S., Rulhania, S., Jaswal, S. ve Monga, V. (2021). Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112923.
- Lee Y.T. (2011). Structure activity relationship analysis of phenolic acid phenethyl esters on oral and human breast cancers: The grey gm(o,n) approach. *Computers in Biology and Medicine*, 41, 506–511.
- León-González, A. J., Jara-Palacios, M. J., Abbas, M., Heredia, F. J. ve Schini-Kerth, V. B. (2017). Role of epigenetic regulation on the induction of apoptosis in jurkat leukemia cells by white grape pomace rich in phenolic compounds. *Food and Function*, 8, 4062–4069.
- Liao, C. C., Chen, S. C., Huang, H. P. ve Wang, C. J. (2018). Gallic acid inhibits bladder cancer cell proliferation and migration via regulating fatty acid synthase (FAS). *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 620-627.
- Liu, Z., Ma, Z., Zhang, H., Summah, B. S., Liu, H., An, D., . . . Xu, D. (2019). Ferulic acid increases intestinal lactobacillus and improves cardiac function in tac mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 120, 109482.
- Liv, N., Mai, Y., Liu, Q., Gou, G. ve Yang, J. (2021). Docetaxel-loaded d- α -tocopherly polyethylene glycol-1000 succinate liposomes improve lung cancer chemotherapy and reverse multidrug resistance. *Drug Delivery Translational Research*, 11, 131-141.
- Malentacchi, F., Simi, L., Nannelli, C., Andreani, M., Janni, A., Pastorekova, S. ve Orlando, C. (2008). Alternative splicing variants of carbonic anhydrase IX in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 64, 271–276.
- Marci, R. C., Campos, I. A. S., Santana, V. T. ve Carlos, R. M. (2021). Chemical implications and considerations on techniques used to assess the *in vitro* antioxidants activity of coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 451, 214275.
- Martinelli, V., Radaelli, M., Straffi, L., Rodegher, M. ve Comi G. (2009). Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients. *Neurological Sciences*, 30, 2, 167-70.
- Mattila, P ve Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 152-160.

- Micheli, L., Collodel, G., Moretti, E., Noto, D., Menchiari, A., Cerretani, D., . . . Signorini, C. (2021). Redox imbalance induced by docetaxel in the neuroblastoma SH-SY5Y cells: A study of docetaxel induced neuronal damage. *Redox Report*, 26, 1, 18-28.
- Morrissey, S. P., Le Page, E. ve Edan, G. (2005). Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. *International MS Journal*, 12, 74-87.
- Nimse, S. B ve Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5, 27986-28006.
- Nohr-Nielsen, A., Bagger, S. O., Br  nner, N., Stenvang, J. ve Lund, T. M. (2020). Pharmacodynamic modelling reveals synergistic interaction between docetaxel and SCO-101 in a docetaxel-resistant triple negative breast cancer cell line. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 148, 105315.
- Nouri, A., Heibati, F. ve Heidarian, E. (2021). Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394, 1-9.
- Olson, B. J. S. C ve Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 48, 1.
- Oun, R., Moussa, Y. E. ve Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton Transactions*, 47, 6645-6653.
- Oyauzu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
-   zt  rk Sarikaya, Gülçin,   . ve Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids. *Chemical Biology & Drug Design*, 75, 515-520.
-   zt  rk Sarikaya, S. B., Topal, F.,   ent  rk, M., Gülçin,   . ve Supuran, C. T. (2011). *In vitro* inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 4259-4262.
- Pal, S. M., Avneet, G. ve Siddhraj, S. S. (2018). Gallic acid: Pharmacological promising lead molecule: A review, 10, 4, 132-138.
- Park, W. H. ve Kim, S. H. (2013). MAPK inhibitors augment gallic acid-induced A549 lung cancer cell death through the enhancement of glutathione depletion. *Oncology Reports*, 30, 513-519.
- Parkkila, S., Lasota, J., Fletcher, J. A., Ou, W. B., Kivel  , A.J ., Nuorva, K., . . . Miettinen, M. (2010). Carbonic anhydrase II. a novel biomarker for gastrointestinal stromal tumors. *Modern Pathology*, 23, 5, 743-750.

- Pashaei, Y., Mebrahi, M. ve Shekarchi, M. (2020). A review on various analytical methods for determination of anthracyclines and their metabolites as anti-cancer chemotherapy drugs in different matrices over the last four decades. *Trends in Analytical Chemistry*, 130, 115991.
- Pastornicka, A., Rybarova, S., Drahosova, S., Mihalik, J., Krehelova, A., Pavliuk-Karachevtseva, A. ve Hodorova, I. (2021). Influence of paclitaxel and doxorubicin therapy of β III-tubulin, carbonic anhydrase IX, and survivin in chemically induced breast cancer in female rat. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 6363.
- Patel, S. S. ve Goyal, R. K. (2011). Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. *Pharmacognosy Research*, 3, 4, 239-245.
- Qiu, Z., Zhou, B., Jin, L., Yu, H., Liu, L., Liu Y., . . . Zhu, F. (2013). *In vitro* antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 428–437.
- Rajeshkumar, S., Kumar, S. V., Ramaiah, A., Agarwal, H., Lakshmi, T. ve Roopan, S. M. (2018). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using mangifera indica leaves and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties in lung cancer (A549) cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 117, 91-95.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology And Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rodriguez-Arce, S. ve Saldias, M. (2021). Antioxidants properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112236.
- Sales, M. S., Roy, A., Antony, L., Banu, S. K., Jeyaraman, S. ve Manikkam, R. (2018). Octyl gallate and gallic acid isolated from terminalia bellarica regulates normal cell cycle in human breast cancer cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 103, 1577-1584.
- Sargazi, A., Shiri, F., Keikha, S. ve Majd, M. H. (2018). Hyaluronan magnetic nanoparticle for mitoxantrone delivery toward CD44 positive cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 150-158.

- Sassa, S., Kikuchi, T., Shinoda, H., Suzuki, S., Kudo, H. ve Sakamoto, S. (2003). Preventive effect of ferulic acid on bone loss in ovariectomized rats. *In Vivo*, 17, 277–280.
- Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. ve Supuran, C. T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16, 12, 1627-1664.
- Sevgi, K., Tepe, B. ve Sarikurkcu, C. (2015). Antioxidants and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 77, 12-21.
- Shabani, S., Rabiei, Z. ve Amini-Khoei, H. (2020). Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: A review. *International Journal of Food Properties*, 23, 1, 736-752.
- Shah, S. M., Ullah, F., Ayaz, M., Wahab, A. ve Shinwari, K. (2019). Phytochemical profiling and pharmacological evaluation of *ifloga spicata* (Forssk.) sch. bip. in leishmaniasis, lungs cancer and oxidative stress. *Pakistan Journal of Botany*, 51, 6, 2143-2152.
- Sheweita, S., Almasmari, A. ve El-Banna, S. (2018). Tramadol-induced hepato-and nephrotoxicity in rats: Role of curcumin and gallic acid as antioxidants. *Plos One*, 13, 8.
- Shokrzadeh, M. ve Ghassemi-Barghi, N. (2018). Genoprotective effects of amifostine againsts mitoxantrone induced toxicity in hepg2 cells, detected via the comet assay. *Advance Pharmaceutical Journal*, 3, 5, 162-168.
- Silverman, D. N. ve McKenna, R. (2007). Solvent-mediated proton transfer in catalysis by carbonic anhydrase. *Accounts of Chemical Research*, 40, 8, 669-675.
- Simi, L., Venturini, G., Malentacchi, F., Gelmini, S., Andreani, M., Janni, A., . . . Orlando, C. (2005). Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 52, 59-66.
- Stewart, D. J., Nunez, M. I., Behrens, C., Liu, D., Lin, Y. H., Lee, J. J., . . . Wistuba, I. I. (2014). Membrane carbonic anhydrase IX expression and relapse risk in resected stage I-II non-small-cell-lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9, 5.
- Sunil Gowda, S. N., Rajasowmiya, S., Vadivel, V., Devi, S. B., Jerald, A. C., Marimuthu, S. ve Devipriya, N. (2018). Gallic acid-coated silver nanoparticle alters the expression of radiation-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small lung cancer cells. *Toxicology In Vitro*, 52, 170-177.
- Supuran, C. T. (2007). Carbonic anhydrase as drug targets-an overview. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7, 9, 825-833.

- Supuran, C. T. (2016). Structure and function of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 473, 14, 2023-2032.
- Şen, E., Öner, İ. ve Ata, Ö. (2018). Hand food syndrome associated with docetaxel treatment in metastatic prostate cancer: A case report. *Acta Oncologica Turnica*.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ. ve Supuran, C. T. (2011). *In vitro* inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology & Drug Design*, 77, 494-499.
- Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M., . . . Ono, Masaya. (2012). Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *International Scholarly Research Network*, 10.
- Tang, D. H. ve Chang, S. C. (2015). Management of carcinoma in situ of the bladder: Best practice and recent developments. *Therapeutic Advances in Urology*, 7, 6, 351-364.
- Taşkapılıoğlu, Ö., Kamacı Şener, D., Turan, A. B., Yurtoğulları, Ş., Tütüncü, A., Güllülü, S., . . . Turan, Ö. F. (2012). Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis: A single-center experience. *Turkish Journal of Nephrology*, 18, 2.
- Thambiraj, S., Shruthi, S., Vijayalakshmi, R. ve Shankaran, D. R. (2019). Evaluation of cytotoxic activity of docetaxel loaded gold nanoparticles for lung cancer drug delivery. *Cancer Treatment and Research Communications*, 21, 100157.
- Tian, J., Teng, M., Song, M., Li, M. S., Zhang, X. ve Xu, Y. (2021). A feasible molecular engineering for birght II-conjugation free radical photosensitizers with aggregation-induced emission. *Dyes and Pigments*, 194, 109651.
- Touisni, N., Maresca, A., McDonald, P. C., Lou, Y., Scozzafava, A., Dedhar, S., . . . Supuran, C. T. (2011). Glycosylcoumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primarily breast tumors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 8271-8277.
- Vaish, S., Gupta, D., Mehrotra, R., Mehrotra, S. ve Basantani, M. K . (2020). Glutathione s-transferase: A versatile protein family. *3 Biotech*, 10, 321.
- Vander Heide, M. G., Cantley, L. C. ve Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-1033.
- Venkat Ratnam, D., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. ve Ravi Kumar, M. N. V. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207.

- Wang, X., Cheng, L., Xie, H. J., Ju, R. J., Xiao, Y., Fu, M., . . . Li, X. T. (2018). Functional paclitaxel plus honokiol micelles destroying tumour metastasis in treatment of non-small-cell lung cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46, 2, 1154-1169.
- Wang, X. Q., Wang, W., Peng, M. ve Zhang, X. Z. (2021). Free radicals for cancer theranostics. *Biomaterials*, 266, 120474.
- Whittle, K., Kao, S., Clarke, S., Grau, G. E. R. ve Hosseini-Beheshti, E. (2022). Exploring the role of extracellular vesicle and their protein cargo in lung cancer metastasis: A review. *Oncology Hematology*, 171, 103603.
- Winum, J. Y., Rami, M., Scozzafava, A., Montero, J. L. ve Supuran, C. (2008). Carbonic anhydrase IX: A new druggable target for the design of antitumor agents. *Medicinal Research Reviews*, 28, 3, 445-463.
- Wu, J., Deng, C., Meng, F., Zhang, J., Sun, H. ve Zhong, Z. (2017). Hyaluronic acid coated PLGA nanoparticulate docetaxel effectively targets and suppresses orthotopic human lung cancer. *Journal of Controlled Release*, 259, 76 –82.
- Yin, W., Pan, F., Zhu, J., Xu, J., Gonzalez-Rivas, D., Okumura, M., . . . Yang, Y. (2021). Nanotechnology and nanomedicine: A promising avenue for lung cancer diagnosis and therapy. *Engineering*, 7, 1577-1585.
- You, B. R., Moon, H. J., Han, Y. H. ve Park, W. H. (2010). Gallic acid inhibits the growth of hela cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1334-1340.
- You, B. R. ve Park, W. H. (2010). Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicology In Vitro*, 24, 1356-1362.
- Yoshiura, K., Nakaoka, T., Nishishita, T., Sato, K., Yamamoto, A., Shimada, S., . . . Yamashita N. (2005). Carbonic anhydrase II is a tumor vessel endothelium-associated antigen targeted by dendritic cell therapy. *Clinical Cancer Research*, 11, 22, 8201-8207.
- Zalewska-Ziob, M., Adamek, B., Kasperczyk, J., Romuk, E., Hudziec, E., Chwalińska, E., . . . Bruliński, K. (2019). Activity of antioxidant enzymes in the tumor and adjacent noncancerous tissues of non-small-cell lung cancer. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, 31, 2901840.
- Zehiroglu, C. ve Ozturk Sarıkaya, S. B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food Sciences and Technology*, 56, 11, 4757-4774.

- Zhang, T., Ma, L., Wu, P., Li, W., Gu, R., Dan, X., . . . 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. *Oncology Reports*, 41, 1779-1788.
- Zhang, L., Bing, S., Dong, M., Lu, X. ve Xiong, Y. (2021). Targeting ion channels for the treatment of lung cancer. *BBA – Reviews on Cancer*, 1876, 188629.
- Zhao, P. ve Astruc, D. (2012). Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy. *ChemMedChem* 7, 6, 952–972.
- Zheng, C., Hu, C., Ma, X., Peng, C., Zhang, H. ve Qin L., 2012. Cytotoxic phenylpropanoid glycosides from *fagopyrum tataricum* (L.), gaertn. *Food Chemistry*, 132, 433–438
- Zulfigar, F. ve Ashraf, M. (2021). Antioxidants as modulators of arsenic-induced oxidative stress tolerance in plants: An overview. *Journal of Hazardous Materials*, 127891.

ÖZGEÇMİŞ

Burhan BUDAK 1995 yılında başlamış olduğu ilköğretim ve liseyi 2006 yılında tamamladıktan sonra 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünü kazanarak 2013 yılında üniversiteden mezun oldu.

2014 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünde başlamış olduğu Yüksek Lisans Eğitimini 2016 yılında tamamladı.

Doktora eğitimine 2017 yılında Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Doktora programında başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evlidir.

Yayınlar:

Budak, B. ve Öztürk Sarıkaya, S. B. (2022). Spirulina: Properties, benefits and health-nutrition relationship. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences*, 11(4), 1654-1662.

Budak, B. ve Dinckaya, E. (2022). L-askorbik asit (C vitamini) tayinine yönelik kalem grafit elektrot-askorbat oksidaz temelli yeni bir biyosensör geliştirilmesi. *International Journal of Life-Sciences and Biotechnology*, 5(3), 611-626.