

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNNAMİK VE KAFEİK ASİT'İN ANTİ-KANSER
ETKİLERİNİN MALİGNANT MEZOTELYOMA
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

DAYK MURATOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNNAMİK VE KAFEİK ASİT'İN ANTİ-KANSER
ETKİLERİNİN MALİGNANT MEZOTELYOMA
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

DAYK MURATOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE
2022

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF ANTI-CANCER EFFECTS
OF CINNAMIC AND CAFFEIC ACID ON
MALIGNANT MESOTHELIOMA CELLS**

DAYK MURATOGLU

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. ASUMAN DEMIROGLU ZERGEROGLU

GEBZE

2022



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/07/2022 tarih ve 2022/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 27/07/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Dayk MURATOĞLU'nun tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Prof. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE

: Doç. Dr. Seda KARABULUT

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Malign mezotelyoma (MM), göğsü, karın boşluğunu ve içerisindeki organların çoğunu kaplayan, mezotelyum adı verilen ince doku tabakasını etkileyen, asbest maruziyeti ile ilişkili nadir ve öldürücü bir kanser türüdür. Henüz MM için etkin bir tedavi bulunmamaktadır. Güncel kanser tedavilerinde doğal kaynaklı ajanlar öne çıkmaktadır. Bu kapsamda, araştırmamızda potansiyel antikarsinojen olabilecek bitkisel kökenli olan sinnamik (CINN) ve kafeik asitin (CA), MM hücreleri üzerindeki anti-kanser etkilerini analiz etmeyi amaçladık. Çalışmamızda bu maddelerin, hücre canlılığı, hücre göçü, hücre döngüsü, hücre ölümü ve bu süreçlerle bağlantılı proteinlere etkileri sırasıyla; MTT, yara iyileşmesi, akım sitometrisi, floresan boyama ve western blot analizleriyle antikarsinojen etkinlikleri *in vitro* sistemde değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız her iki fenolik asitin hücre canlılığını konsantrasyona bağlı bir şekilde azalttığını göstermektedir. Analizler hücre canlılığını düşürürken CA'nın CINN'a göre daha düşük konsantrasyonlarda etkin olduğunu ve normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerine seçiciliğinin CINN'a göre daha yüksek olduğunu işaret etmiştir. Bu nedenle daha detaylı analizlere CA ile devam edilmiştir. IC₅₀ değerleri baz alınarak yapılan yara iyileşmesi deneyleri, konsantrasyona ve zaman bağlı olarak CA uygulamalarının yara iyileşmesini geciktirdiğini göstermektedir. CA uygulamaları kanser hücresi proliferasyonunda etkin olan ERK1/2 ve AKT proteinlerinin aktivasyonunu düşürürken, STAT3 fosforilasyonlarını etkilememiştir. Aynı zamanda CA, MM hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre döngüsünü G2/M fazında tutuklarken, p21 ve p27 proteinlerinin ifadesinin konsantrasyona bağlı olarak artmasına neden olmuştur. İlaveten, CA hücreleri apoptoza yönlendirirken Bax seviyesini arttırmış ve PARP seviyesinde azalışa neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Malignant Mezotelyoma, Sinnamik Asit, Kafeik Asit, Hücre Ölümü.

SUMMARY

Malignant mesothelioma (MM) is a rare and lethal cancer that has no effective treatment, associated with asbestos exposure, affecting the thin layer of tissue called the mesothelium, covering the chest, abdominal cavity and most of the organs within. We aimed to analyze the anti-cancer effects of cinnamic (CINN) and caffeic acid (CA), which may be potential anticarcinogens on MM cells since natural agents are at the forefront in current cancer treatments. In our study, the effects of these substances on cell viability, cell migration, cell cycle, cell death and proteins associated with these processes were evaluated *in vitro* by MTT, wound healing, flow cytometry, fluorescent staining and western blot analysis, respectively. Our results demonstrate that both phenolic acids reduce cell viability in a concentration-dependent manner. Analyzes indicated that while reducing cell viability, CA was effective at lower concentrations than CINN, and had a higher selectivity for cancer cells compared to normal cells. Therefore, detailed analyzes were continued with CA. Wound healing experiments based on IC₅₀ values indicate that CA delays wound closure depending on concentration and time. While CA decreased activation of ERK1/2 and AKT proteins, which are active in cancer cell proliferation, it did not affect STAT3 phosphorylation. Furthermore, CA arrested cell cycle at the G2/M phase depending on the concentration in MM cells, it caused the expression of p21 and p27 proteins to increase depending on the concentration. In addition, CA increased the level of Bax and decreased the level of PARP while directing the cells to apoptosis.

Key Words: Malignant Mesothelioma, Cinnamic Acid, Caffeic Acid, Cell Death.

TEŞEKKÜR

Başta yüksek lisans eğitimimde, akademik hayatımda bana fırsatlar tanıyan, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ve deneyimi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU hocama,

Eğitimim sürecinde yanımda yer alan, bilgisi ve deneyimleriyle bana birçok kazanım sağlayan, KASIAL çalışma arkadaşlarımdan başta Gülseren TURHAL olmak üzere Büşra DEMİRKAN, İzel Nermin BAŞLILAR ve Nimet Şule YÜNCÜ'ye,

Bu çalışmayı projelendiren (G.T.Ü. BAP 2021-A-101-11) ve destekleyen Gebze Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Lisans ve yüksek lisans süresince sırt sırta verdiğimiz, sürekli kendimi geliştirmemi sağlayan değerli dostum Korkut Furkan ŞAHİN'e,

Uzun yıllardır bana inanarak akademik hayatımı destekleyen, beni ben yapan aileme, dostlarıma ve tüm hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. MALİGNANT MEZOTELYOMA	3
2.1. Patogenez ve Sinyal Yolları	4
2.1.1. PI3K/AKT	5
2.1.2. MAPK/ERK	7
2.1.3. JAK/STAT	8
2.2. Apoptoz ve Kanser	10
2.3. Sinnamik ve Kafeik Asit	11
2.4. Tedavi Yöntemleri	14
2.4.1. Kemoterapi	14
2.4.2. Radyoterapi	14
2.4.3. Cerrahi	15
2.4.4. İmmünoterapi	15
2.4.5. Üçlü Kombinasyon (Modalite) Tedavisi	16
3. MATERYAL ve METOT	17
3.1. Hücre Kültür Uygulamaları	17
3.1.1. CINN ve CA Uygulamaları	17
3.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	18
3.3. Hücre Göçünün Analizi	18
3.4. Hücre Döngüsü Analizi	19
3.5. Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi	20
3.5.1. AO/EtBr	20

3.5.2. DAPI/PI	21
3.6. Protein Analizleri	21
3.6.1. Protein İzolasyonları	22
3.6.2. SDS-PAGE ve Western Blotlama	22
3.6.3. İmmün Belirleme	23
4. SONUÇLAR	25
4.1. CINN ve CA'nın Hücre Canlılığına Etkisi	25
4.2. CA'nın Yara İyileşmesine Etkisi	28
4.3. CA'nın Hücre Döngüsüne Etkisi	30
4.4. CA'nın Hücre Ölümüne Etkisi	34
4.5. CA'nın Proliferasyon, Hücre Döngüsü ve Hücre Ölümünde Yer Alan Anahtar Proteinlere Etkisi	40
5. TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
AO	: Akridin turuncusu
ARF	: Alternatif okuma çerçevesi
BAP1	: BRCA1 ile ilişkili protein 1
BARD1	: BRCA1 ilişkili RING bölgesi proteini 1
BCA	: Bikinkoninik asit
BRCA1	: Meme Kanseri Tip 1
CA	: Kafeik asit
CDKN2A	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CDKN2B	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2B
CINN	: Sınnamik asit
CTLA-4	: Sitotoksik T-lenfosit antijeni 4
DAPI	: 2-(4-amidinojenil)-1H-indol-6-karboksamidin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
EtBr	: Etidyum bromür
FBS	: Fetal sığır serumu
FOXO3a	: Çatal başlı kutu O3 proteini
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
Hippo	: Salvador-Warts-Hippo
HRP	: Yaban turpu peroksidaz
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAK/STAT3	: Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
MAPK	: Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz
MDM2	: Mouse Double Minute 2
Merlin	: Moesin-ezrin-radiksin benzeri protein

MKK/MAP2K	: MAPK kinaz
MKKK/MAP3K	: MAPK kinaz kinaz
MM	: Malign mezotelyoma
MMP-9	: Matris metalloproteinaz 9
mTORC1/2	: Rapamisinin memeli hedefi kompleksi 1/2
MTT	: 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
NF2	: Nörofibromatoz Tip 2
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa B
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PD-1	: Programlanmış hücre ölüm proteini-1
PDK1	: Fosfoinositide bağımlı kinaz 1
PD-L1	: Programlanmış hücre ölüm proteini-1 ligandı
P-gp	: P-glikoprotein
PI	: Propidyum iyodür
PI3K	: Fosfoinositid 3 kinaz
PIAS	: Aktifleştirilmiş STAT'ların protein inhibitörleri
PIP2	: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RSK	: Ribozomal S6 kinaz
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SI	: Seçicilik indeksi
SOCS	: Sitokin sinyalinin baskılayıcıları
SV40	: Simian Virüsü 40
TBS-T	: Tris tamponlu salin-tween 20

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu ve bazı düzenleyicilerini gösteren model.	6
2.2: MAPK/ERK sinyal yolu ve bu yolun PI3K/AKT yolu ile ilişkisini gösteren model.	8
2.3: JAK/STAT3 sinyal yolu ve bu sinyal yolunun inhibitörlerini gösteren model.	9
2.4: Apoptoz mekanizmasının, iç ve dış sinyal yollarının ana bileşenlerini gösteren model.	11
2.5: CINN molekülünün iki boyutlu yapısı.	12
2.6: CA molekülünün iki boyutlu yapısı.	13
4.1: CINN uygulamalarından sonra hücre canlılığının konsantrasyona bağlı inhibisyonu.	26
4.2: CA uygulamalarından sonra hücre canlılığının konsantrasyona bağlı inhibisyonu.	27
4.3: CA'nın SPC111 hücrelerinde 0-48 saat aralığında hücresel yara kapanmasına etkisi.	29
4.4: CA'nın SPC212 hücrelerinde 0-48 saat aralığında hücresel yara kapanmasına etkisi.	30
4.5: CA'nın SPC111 hücre döngüsü üzerine etkisi.	32
4.6: CA'nın SPC212 hücre döngüsü üzerine etkisi.	33
4.7: Met-5A hücrelerinde hücre ölümünün ve morfolojisinin gösterimi.	35
4.8: SPC111 hücrelerinde hücre ölümünün ve morfolojisinin gösterimi.	36
4.9: SPC212 hücrelerinde hücre ölümünün ve morfolojisinin gösterimi.	37
4.10: SPC111 ve SPC212 hücrelerinde 100 µM CA uygulaması sonucu hücre ölümünün ve morfolojisinin DAPI/PI boyaması ile gösterimi.	39
4.11: CA'nın hücresel protein seviyelerine etkisi.	41

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi, çoğalması ve bu hücrelerin metastaz yapma veya ikincil tümörler oluşturma yeteneğine sahip olduğu hastalıklar grubudur [Baykara, 2016; Hausman, 2019]. Genetik ve çevresel olmak üzere oluşumunda çeşitli faktörlerin mevcut olduğu kanser, dünya çapında en sık karşılaşılan ölüm nedenlerinden biridir [Wang et al., 2018]. Yakın zamanda yapılan araştırmalara göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde kanserden ölüm oranlarının hem erkeklerde hem de kadınlarda düşmeye devam ettiği ve kanser insidansının erkeklerde sabit iken kadınlarda biraz arttığı belirlenmiştir [Henley et al., 2020]. Avrupa'da ise kanser insidansı ve kanserden ölüm oranları zamanla artmaktadır, bu artışın önemli faktörlerinden biri nüfusun yaşlanması olarak görülmektedir [Hofmarcher et al., 2020]. Türkiye'deki kanser insidansının da artış eğiliminde olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de en çok görülen kanser türleri sırası ile; erkeklerde akciğer, prostat, kolorektal, mesane ve mide iken kadınlarda meme, tiroit, kolorektal, akciğer ve uterus korpusu şeklindedir [Web 1, 2021].

Biz bu çalışmada Türkiye için özellikle coğrafi olarak önem taşıyan bir kanser türü olan malignant mezotelyoma (MM) üzerine yoğunlaştık. Bu kapsamda çalışmamızda kullandığımız fenolik asitlerin MM hücrelerindeki sitotoksitesine, hücre döngüsüne, hücre göçüne, hücre ölümüne ve bu olaylarda rol alan proteinlere etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Son yıllarda, kanser tedavisine yönelik olarak, özellikle bitkisel kaynaklı tedavilere ve ilaçların üretimine önem verilmektedir. Bunun nedeni, bu moleküllerin doğal olarak anti-kanserojen özellikler göstermesidir. Sinnamik asit (CINN) ve kafeik asit (CA), günlük insan diyetinde de bulunan fenolik asitlerdir. Yapılan çalışmalarda bu fenolik asitlerin bazı kanser hücrelerinde hücre döngüsünü durdurduğu, proliferasyonu azalttığı ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir. Bilindiği gibi, hücre sinyal ileti sistemlerindeki bozukluklar, kontrolsüz hücre büyümesi ve proliferasyon ile baskılanmış apoptoza neden olmaktadır. Bunun sonucunda da hücreler kanserleşme eğilimi göstermektedir. Bu nedenlerle, kanserli hücrelerdeki sinyallerinin

araştırılmasının gerekli ve önemli olduğu kabul edilmektedir. CINN ve CA kullanılarak birçok kanser çalışması yapılsa da bu fenolik asitlerin sinyal yollarına etkisiyle ilgili bilgiler sınırlı sayıdadır. İlaveten, bu moleküllerin MM hücrelerindeki etkisine dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda mezotelyal hücreler (Met-5A) ile iki farklı MM hücre modeli (SPC212 ve SPC111) kullanılmıştır. Bu çalışma ile literatüre önemli katkıların sağlanması hedeflenmektedir.

Bu kapsamda, çalışmamızdaki amaçlarımız;

- CINN ve CA'nın kanser hücresi ve normal hücre canlılığına, hücre göçüne ve hücre döngüsüne etkilerinin belirlenmesi,
- Kanser oluşumunda ve gelişiminde, hücre proliferasyonu ve hayatta kalımında öneme sahip olan ve kanser hücrelerinde düzenleri bozulmuş olan MAPK/ERK, PI3K/AKT ve JAK/STAT gibi sinyal yollarındaki anahtar proteinlere etkisinin açıklığa kavuşturulması,
- Kanser hücrelerinde, uygulanan maddelerin programlanmış hücre ölümü olan apoptoza etkisinin belirlenmesi

şeklinde sıralanabilir.

Araştırmamız sonucunda alınan sonuçlar ile her iki fenolik asitin, MM tedavisi için kullanılabilirliği konusuna ön veri sağlanmıştır. Bunu izleyen dönemde yapılması planlanan daha detaylı analiz ve projelerin başlangıç adımı olarak görülmektedir. MM için etkin bir tedavi bulunmamaktadır. Bu nedenle alternatif ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2. MALİGNANT MEZOTELYOMA

Malignant Mezotelyoma veya Malign Mezotelyoma (MM), göğsü, karın boşluğunu ve içerisindeki organların çoğunu kaplayan, mezotelyum adı verilen ince doku tabakasını etkileyen nadir ve saldırgan bir kanserdir [Web 2, 2021]. MM etkilediği mezotel dokuya göre plevral, peritoneal ve perikardiyal olarak sınıflandırılabilir ve aralarında en yaygın olanı plevral mezotelyomadır [Coşan vd., 2016]. Plevral mezotelyomaların yaklaşık %70 ila %90'ı kanserojen mineral liflere, özellikle asbeste maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir; peritoneal mezotelyoma için bu oran daha düşüktür. İnsan mezotelyal hücreleri asbest sitotoksitesine çok duyarlıdır ve kronik enflamasyon ile genetik ve epigenetik değişiklikler dahil birçok patojenik mekanizma ile karsinogeneze katkıda bulunabilir. MM'nin diğer nedenleri arasında erionit (Türkiye'de de görülen ve kayalarda bulunan bir mineral), göğüs duvarı radyasyonu ve Simian Virüsü 40 (SV40) yer alır. Asbest gibi lifli bir silikat olan erionitin yüksek oranda kanserojen olduğu bilinmekte ve MM riskinin arttığı rapor edilen köylerde ev inşası için kullanılan bazı taşlarda tespit edilmiştir. SV 40 ise tümör baskılayıcı genleri bloke eden onkogenik bir virüstür, nedensellik kanıtı zayıf olmasına rağmen MM gelişiminde bir kofaktör olarak işlev görebilir [Bibby et al., 2016; Galani et al., 2019].

MM'den etkilenmeler dalgalanmalar şeklinde ifade edilmiştir; bunlardan ilki ham asbest ve asbestli ürünlerin üretiminde yer alırken, ikinci dalgada sanayide asbestli malzeme üreten işçiler etkilenmiştir. Üçüncü dalga ise hastalıktaki epidemiyolojik kaymadan kaynaklanan risk gruplarında görülmüştür. Bu gruplar, daha belirsiz bir maruz kalma geçmişi olan kısa süreli veya düşük seviyeli asbeste maruz kalmış kişilerden oluşur. Bu maruz kalma şekli, ev içinde asbeste maruz kalma (asbeste maruz kalmış işçilerinin aileleri), yakında bulunan asbest endüstrisinden kaynaklanan kirlilik veya asbest içeren malzemelere (asbest içeren binalar, yaşanan evler) maruz kalma yoluyla ortaya çıkabilir. Asbestle kontamine toprak karışımlarının kullanımı yoluyla ve çevresel koşullar aracılığıyla asbeste maruz kalmanın, Türkiye'nin kırsal bölgelerinde yüksek bir MM riskine neden olduğu gösterilmiştir. Büyük bir çoğunluğun tarım ile uğraştığı bu bölgelerdeki köylüler, bu toprağı zeminde, duvarlarda ve çatılarda olmak üzere ısı ve su yalıtımında badana ve sıva malzemesi olarak, çömlek yapımı ve çömlekçilik gibi faaliyetlerde kullandıkları gösterilmiştir ve

buna ek olarak bebek pudrasında kullanıldığı bilinmektedir [Metintas et al., 2017; Metintaş et al., 2020].

2.1. Patogenez ve Sinyal Yolları

MM, altta yatan karmaşık moleküler değişikliklere sahip heterojen bir kanserdir. Mezotelyal hücreler, asbest sitotoksitesine karşı oldukça hassastır. Mezotelyal hücrelerin deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı, hücre döngüsü inhibisyonu ve apoptoz gibi asbestin neden olduğu çeşitli hücresel değişikliklerden etkilendiği literatürde belirtilmiştir [Hajj et al., 2021]. Aynı zamanda bu hücrelerde onkogenik transformasyonu, hücresel proliferasyonu ve invazyonu kolaylaştıran genetik anormalliklerin sürekli edinimi, tümörögenез sürecinde merkezi mekanizma olduğu belirtilmektedir [Guo et al., 2015].

BRCA1 ile ilişkili protein 1 (BAP1), geninin MM'de en sık mutasyona uğramış genlerden biri olduğu ve tümörlerin yarısından fazlasını etkilediği bildirilmiştir [Li et al., 2018]. Genel olarak, diğer kanser türlerinde de fonksiyonel olarak sıklıkla kaybı görülen BAP1, bir kromozomal bölge olan 3p21'de lokalizedir. Bu fonksiyonel kayıp anlamsız somatik mutasyonlar, uç birleştirme değişiklikleri (splice alterations), gen füzyonları ve kopya sayısı değişikliklerinden kaynaklanmaktadır [Sayan et al., 2019]. BAP1, hücre döngüsü ilerlemesini, hücresel proliferasyonu ve farklılaşmayı, Ca^{2+} sinyali aracılı apoptozu, ferroptozu ve enerji metabolizmasını kontrol eden hedef genlerin ekspresyonlarını düzenleyerek önemli hücresel süreçleri yönetmektedir. Ayrıca BAP1, Meme Kanseri Tip 1 (BRCA1) ve BRCA1 ilişkili RING bölgesi proteini 1 (BARD1) gibi bir dizi nükleer protein ile etkileşime girer ve homolog rekombinasyonu ve çift zincir kırılması onarımını destekleyen aktif bir multiprotein kompleksi oluşturmakta, böylece genomik stabiliteyi koruyarak bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir [Hmeljak et al., 2018; Cakiroglu and Senturk, 2020].

Farklı orijinli birçok primer tümör tipinde sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A) lokusunun, özellikle 9p21'de homozigot delesyonların sıklıkla olduğu gösterilmiştir [Spugnini et al., 2006]. Benzer şekilde, CDKN2A, MM vakalarının yaklaşık yarısında silinen en sık inaktive edilmiş tümör baskılayıcı genlerden biridir [Aggarwal and Albelda, 2018]. Daha az sıklıkta olmakla birlikte, tipik olarak CDKN2A ve onun sentenik geni sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2B'nin (CDKN2B)

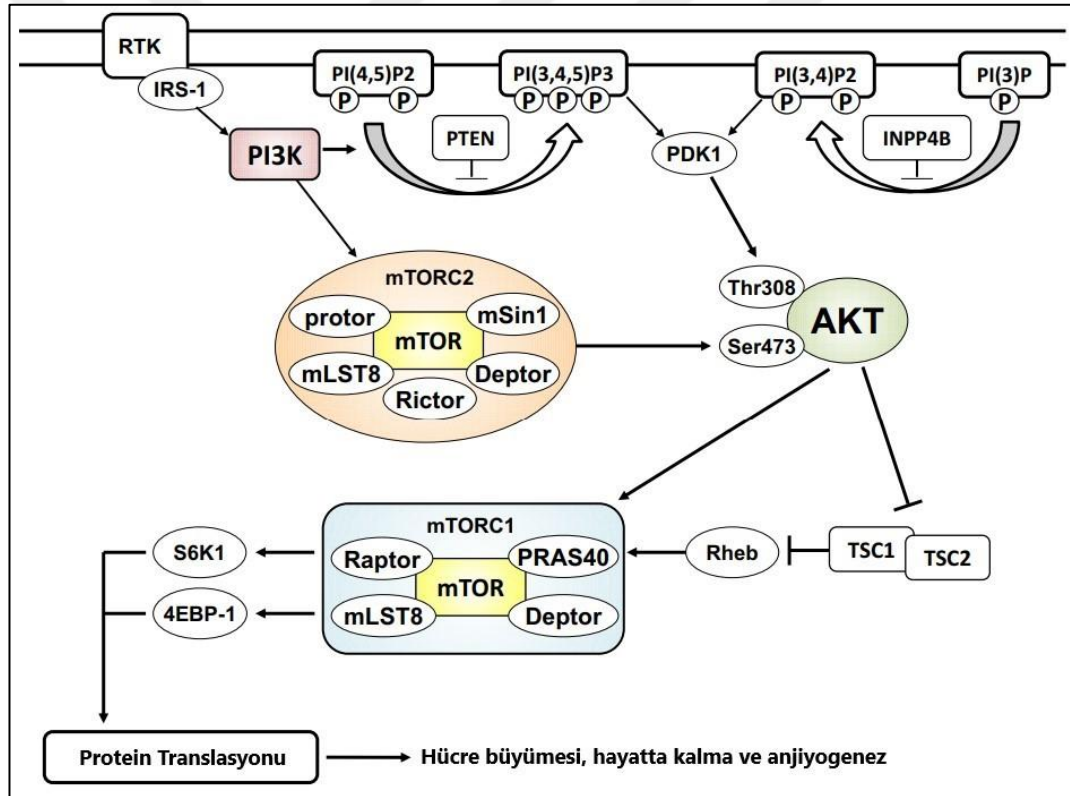
birlikte delesyonu ile karakterize edilen INK4 lokusunun tam genetik kaybı da MM'de gözlemlenmektedir. İnsan CDKN2A geni, alternatif okuma çerçevelerinde (ARF'ler) ortak ikinci eksonun translasyonu ile alfa ve beta olmak üzere iki farklı tümör baskılayıcı proteini kodlamaktadır. Spesifik olarak, alfa transkripti p16INK4A'yı kodlarken, beta transkripti p14ARF'dir. Ayrıca CDKN2B geni, p15INK4B proteinini kodlamaktadır [Xio et al., 1995; Jha et al., 2012]. Bu kodlanan proteinlerden p14ARF, p53'ün degrede olmasından sorumlu E3 ubiquitin-protein ligazı olan Mouse Double Minute 2'nin (MDM2) fonksiyonlarını antagonize ederek hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynamaktadır [Vivo et al., 2015]. Ayrıca p16INK4A ve p15INK4B, yapısal ve işlevsel olarak, sikline bağımlı kinaz inhibitörlerine benzer homolog proteinlerdir. Bu işlev benzerlikleri ile CDK4/6 aktivitesini inhibe ederek, retinoblastoma tümör baskılayıcı proteinin hipofosforilasyonuna ve fonksiyonel aktivasyonuna neden olmaktadır, böylece hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre proliferasyonunu önlemektedirler [Sawai et al., 2012].

MM'deki bir diğer değişiklik ise tümörlerin neredeyse yarısında da meydana gelen Nörofibromatoz Tip 2 (NF2) geninin inaktivasyonunu içermektedir. NF2 geninin inaktivasyonu, 22q12 lokusunun homozigot kromozomal kaybı ve fokal delesyonlar ile ilişkili bir şekilde gerçekleşmektedir [Schroeder et al., 2014]. Yüksek oranlı gen füzyonları, ekleme kusurları ve çerçeve kayması, yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlar sebebi ile NF2 geni tarafından kodlanan tümör baskılayıcı moesin-ezrin-radiksin benzeri protein'in (Merlin), düşük ekspresyonları ya da eksikliği de bildirilmiştir [Cooper and Giancotti, 2014]. Bu kapsamda, yapılan çalışmalarda Merlin'in; epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), fosfoinositid 3 kinaz (PI3K), rapamisin'in memeli hedefi kompleksi 1/2 (mTORC1/2), Hippo (Salvador-Warts-Hippo), Rac ve Ras GTPaz efektör yolları gibi çeşitli moleküler yolların sinyal iletim aktivitelerini sınırlayarak hücre çoğalmasını engellediği ortaya koyulmuştur [Petrilli and Fernández-Valle, 2016; Sayan et al., 2020].

2.1.1. PI3K/AKT

PI3K/AKT yolunun, MM'de aşırı aktive olduğu bildirilmiştir. MM hücre hatlarının %62'sinde AKT aktivasyonu rapor edilmiştir [de Assis and Isoldi, 2014]. PI3K/AKT yolağı hücre döngüsünün aktiviteleri, hücresel proliferasyonu, büyüme,

hayatta kalma, protein sentezi ve glikoz metabolizması gibi süreçlerde rol alan (Şekil. 2.1) bir yolaktır [Mabuchi et al., 2015]. Büyüme faktörleri, sitokinler veya kemokinler reseptör tirozin kinazların (RTK) aktivasyonunu uyarır ve PI3K moleküllerini aktive edebilen önemli ikincil sinyal moleküllerinin aşağı akış aktivasyonuna izin verir [Chen et al., 2016]. Bu kinazlar fosfatidilinositol-4,5-bifosfatın (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfata (PIP3) dönüşümünü katalize eder. Bu lipid ürünleri, AKT, mTORC2 ve fosfoinositite bağımlı kinaz 1 (PDK1) gibi pleckstrin homolojisi alanı içeren proteinleri çağırabilir [O'Donnell et al., 2018]. Son olarak AKT, hücre büyümesini ve protein sentezini destekleyen mTORC1'i aktive eder [Xie et al., 2019]. Fizyolojik rolü ile tutarlı olarak, PI3K/AKT/mTOR yolunun birçok kanser türünde hiperaktif olduğu bulunmuştur [Boussios et al., 2018].



Şekil. 2.1: PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu ve bazı düzenleyicilerini gösteren model.

Bu sinyal iletiminin negatif düzenleyicisi olan fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) molekülünün işlevsiz hale gelmesi, PI3K sinyal iletim sistemini hücrede sürekli aktif hale getirir. PI3K/AKT yolağının bloke edilmesi, tümör hücrelerinin

çoğalmasını ve büyümesini inhibe ederek onları apoptoza duyarlı hale getirebilmektedir [Costa et al., 2018; Lien et al., 2017].

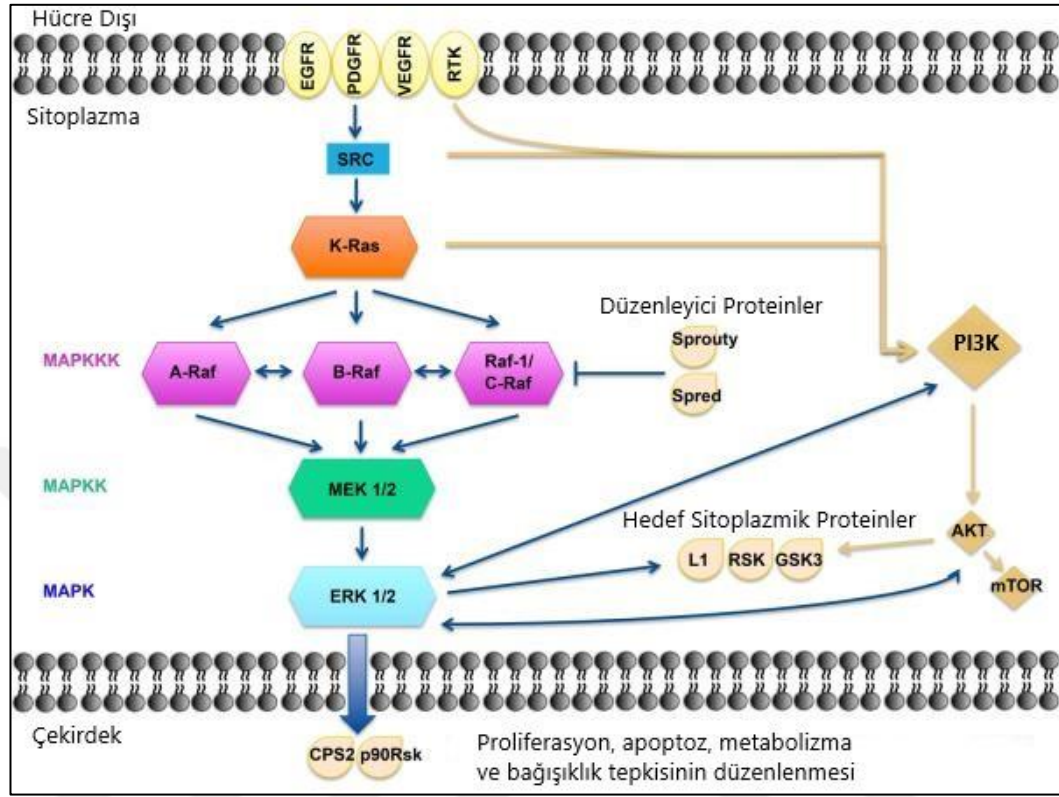
MM'de asbest liflerinin, mitoz sırasındaki kromozom ayrılmasına mekanik müdahale yoluyla veya daha büyük olasılıkla, mutajenik reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen (iNOS) türleri oluşturmak için asbeste bağlı mezotelyal hücrelerin ve makrofajların indüksiyonu yoluyla dolaylı olarak DNA hasarına neden olabileceği *in vitro* koşullarda gösterilmiştir [Carbone and Yang., 2012]. Ortamdaki oksidan seviyeleri sürekli olarak yüksek ise, çeşitli patofizyolojik koşullarda, özellikle tümör mikro çevresinde oksidatif stresin hakim olması muhtemeldir. Bunun sonucunda, mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve / veya PI3K/AKT sinyali gibi çoklu onkojenik sinyalleşme kaskadları aktive olabilmektedir [Gandhi and Nair., 2020].

2.1.2. MAPK/ERK

MAPK kaskadı, insan kanser hücresinin hayatta kalması, yayılması ve ilaç tedavisine direnç için kritik bir yoldur [Sekido., 2008]. Bu yol, çoğalma, büyüme ve yaşlanma gibi çok sayıda kritik hücre fonksiyonu düzenlemektedir [Santarpia et al., 2012].

MAPK kinaz kinaz (MKKK/MAP3K), MAPK kinaz (MKK/MAP2K) ve MAPK olmak üzere üç ana bileşen içeren bu yolak genellikle reseptör aktivasyonun GTPaz proteini olan Ras'ın aktivasyonu ile başlar. Ras MAP3K'yi, MAP3K'de MAP2K'yi fosforilasyon yolu ile aktive eder ve daha sonra da aktive edilen MAP2K, MAPK'yi aktive etmektedir [Dhillon et al., 2007]. Membran reseptörü aktivasyonundan sonra adaptör proteinler, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazların (ERK) aktivasyonu ile sonuçlanan adımları aktive etmek için RAS proteinlerini çağırır. Ardışık fosforilasyon adımları, ERK sitoplazmik ve / veya nükleer hedeflerini aktive edene kadar Raf → MEK → ERK sinyalini yükseltir (Şekil. 2.2). Düzenleyici fosfatazlar, Sprouty ve Spred, sinyalin yoğunluğunu modüle eder. PI3K-AKT yolu, normal koşullar altında ve kanser hücresinde MAPK/ERK yoluyla etkileşime girer. Ribozomal S6 kinazlar (RSK), glikojen sentaz kinaz 3 ve adezyon molekülü L1 hedef sitoplazmik proteinler olarak gösterilebilirken, çekirdekteki hedef proteinler olarak ise CPS2, p90Rsk, c-Myc ve c-Fos gösterilebilmektedir [Burotto et al., 2014; Kim and Choi., 2010]. ERK'nin çekirdekteki hedefleri, büyük ölçüde hücre proliferasyonunda

yer alan transkripsiyon faktörlerinden oluşmakta ve onkojenik transformasyonda oldukça önemli oldukları belirtilmektedir [Liu et al., 2018].



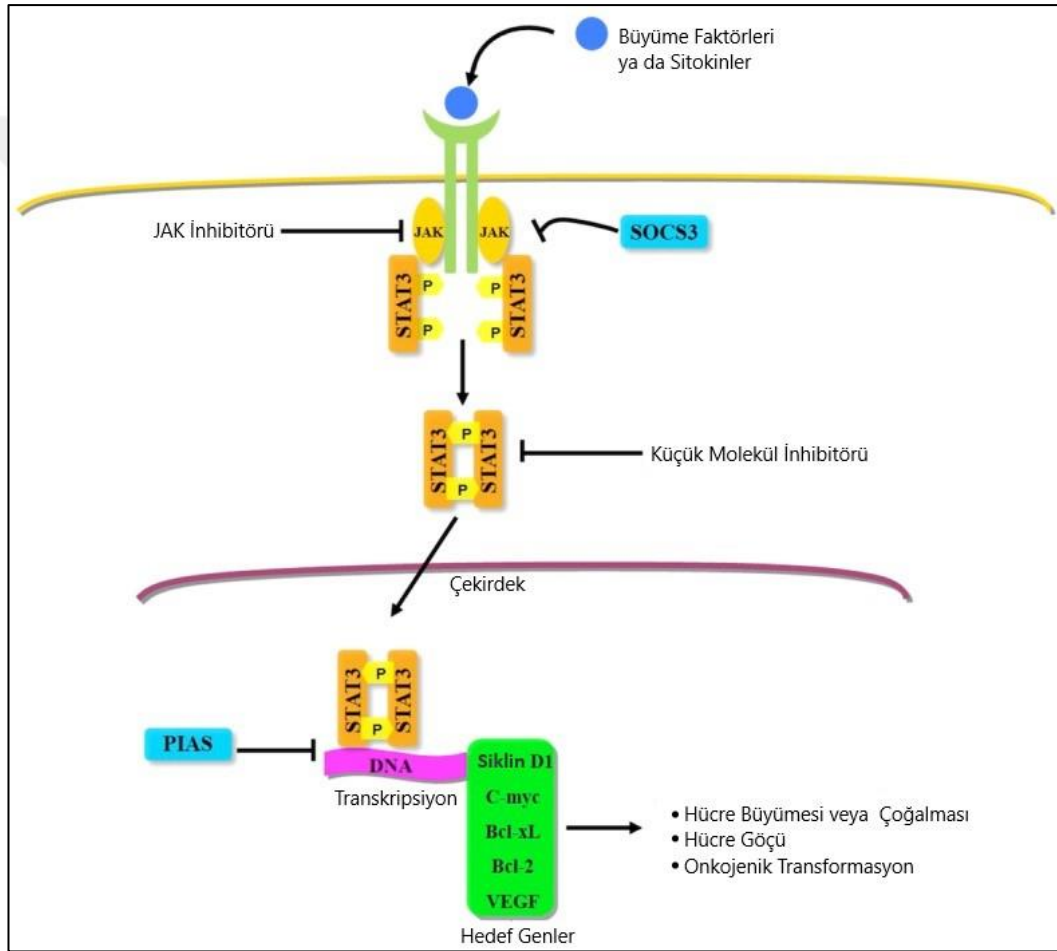
Şekil. 2.2: MAPK/ERK sinyal yolu ve bu yolun PI3K/AKT yolu ile ilişkisini gösteren model.

Sürekli ERK aktivasyonu, bu kararsız transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu kolaylaştırabilmekte ve bununla birlikte stabilizasyonuna ve birikimine yol açarak hücre proliferasyonunu teşvik edebilmektedir. Sürdürülen ERK aktivasyonu, hücre döngüsü ilerlemesine izin vererek, anti-proliferatif Tob ve çatal başlı kutu O3 (FOXO3a) proteinlerinin inhibisyonunu da kolaylaştırabilmektedir [Maik-Rachline et al., 2019]. ERK sinyali, farklı sinyal yolları ile apoptozu hem teşvik edebilir hem de inhibe edebilirken, sürekli veya aşırı aktif ERK sinyali genellikle anti-apoptotik sonuçlarla ilişkilendirilmektedir [Barbosa et al., 2021].

2.1.3. JAK/STAT

Kanser sinyal yolları arasında bulunan bir diğer önemli yol ise Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (JAK/STAT3) yoludur (Şekil. 2.3). Geçici

STAT3 aktivasyonu, kritik biyolojik fonksiyonları göz önüne alındığında, doku bütünlüğü ve restorasyonu, yara iyileşmesi ve aynı zamanda bağışıklık yanıtının önemli bir belirleyicisidir [Gu et al., 2020]. STAT3, standart koşullar altında geçici aktivasyon sağlamak için yoğun bir şekilde düzenlenmiştir. Bu sürece aracılık etmek için, sinyal yolunda STAT3'ün yukarısında yer alan üç protein sınıfı; tirozin fosfatazlar, aktifleştirilmiş STAT'ların protein inhibitörleri (PIAS) ve sitokin sinyalinin baskılayıcıları (SOCS) dahil aktivasyonunun negatif regülasyonunu etkiler [Pencik et al., 2016].



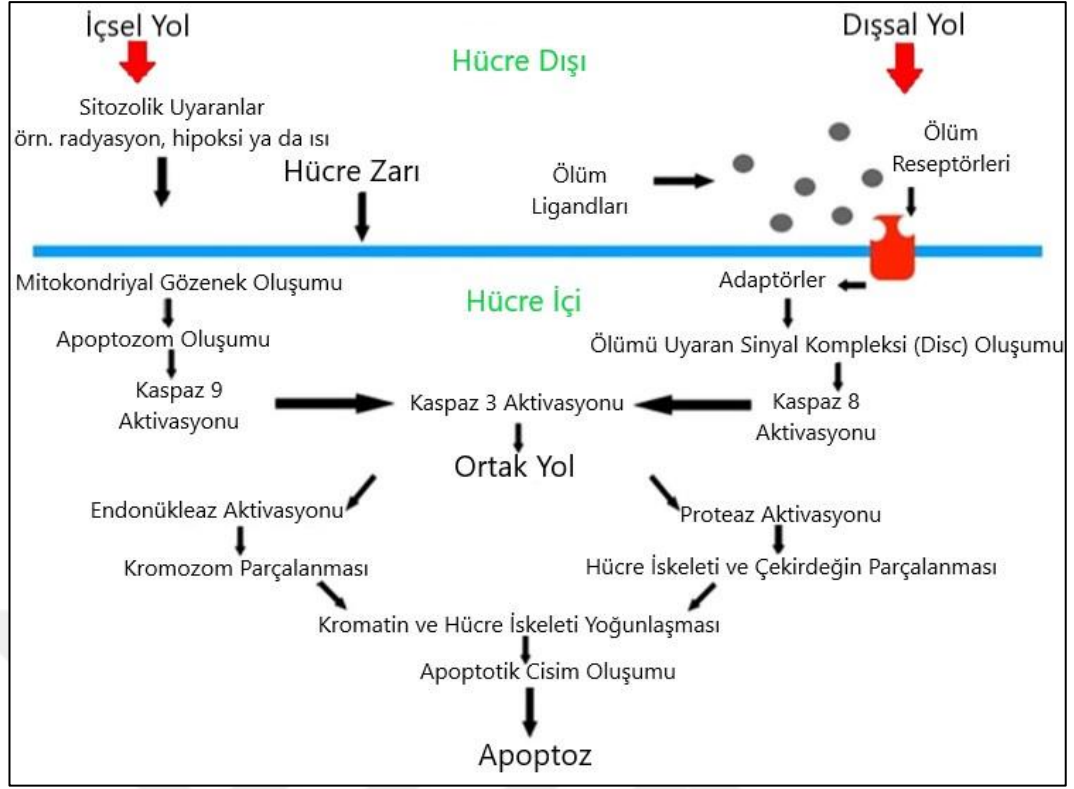
Şekil. 2.3: JAK/STAT3 sinyal yolu ve bu sinyal yolunun inhibitörlerini gösteren model.

Hücre yüzeyi reseptörünün sitokin aracılı stimülasyonu üzerine reseptör üzerindeki JAK proteini fosforile edilir ve STAT3 monomerlerini çağırır. STAT3, JAK'a bağlanır ve fosforile edilir. Fosforile STAT3 daha sonra JAK'tan ayrılır ve bir dimer oluşturmak için sitozolik fosforile edilmiş STAT3'e bağlanır. STAT3 dimeri

çekirdeğe yönelir ve akış aşağı genlerin transkripsiyonunu sağlar [Groner and von Manstein., 2017]. STAT'ların anormal aktivasyonu birçok tümörde görülmüştür. Bu anormal aktivasyonun nedenlerinin araştırılması ve sürekli aktif STAT moleküllerinin hedeflenmesi kanser araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır [O'Shea et al., 2015]. Arşivlenmiş MM vakalarının %61,4'ünde, STAT3'ün aktive edilmiş olduğu tespit edilmesine rağmen STAT3'ün MM'deki kesin rolü iyi tanımlanmamıştır, ancak tirozin kinazların MM'de nadiren mutasyonel olarak aktive edildiği belirtilmiştir [Lapidot et al., 2020].

2.2. Apoptoz ve Kanser

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz yoluyla kanser hücrelerinin etkin bir şekilde ortadan kaldırılması, otuz yılı aşkın bir süredir klinik kanser tedavisinin temel dayanağı ve hedefi olmuştur [Kiraz et al., 2016]. Apoptotik kontrolün kaybı, kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmasına sebep olmaktadır ve bu kontrol mekanizmasının kaybı ile tümör gelişimi sırasında istilacılığı artırabilen, anjiyogenezi uyarabilen, hücre proliferasyonunu düzensizleştiren ve farklılaşmaya müdahale edebilen mutasyonların birikmesi için daha fazla zaman verir [Pfeffer and Singh, 2018]. Apoptoz, birçok karmaşık mekanizma ve sinyal yolları ile yukarıda anlatılan sinyal yolları ile direkt veya dolaylı olarak bağlantılıdır [Carneiro and El-Deiry, 2020]. Apoptoz, çeşitli sebeplerden stres sonucu hasarlanan, DNA hasarı olan veya gelişim sırasında meydana gelen hasarlı hücrelerin düzenli ve verimli bir şekilde sindirilmesini sağlar. Apoptoz gen seviyesinde hassas bir şekilde düzenlenir. Apoptoz mekanizması karmaşıktır ve birçok sinyal yolunu içerir. Apoptoz, bir hücrede kaspaz aracılı iç veya dış (mitokondriyal) yollardan tetiklenebilir. Her iki yol da sonuçta morfolojik ve biyokimyasal hücresel değişiklikler meydana getirerek, apoptozun özellikleri ile sonuçlanan efektör apoptotik kaspazları aktive etmek için birleşir [Elmore, 2007; Kaczanowski, 2016]. İçsel apoptoz yolu, hasara yanıt olarak hücrenin kendisi tarafından başlatılır. Dışsal yol, bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından uyarılan ölüm reseptörleri yoluyla başlatılır. Her iki yol da kaspaz 3 aktive edildiğinde (Şekil. 2.4) birleşerek hücre ölümüne neden olur [D'Arcy, 2019].



Şekil. 2.4: Apoptoz mekanizmasının, iç ve dış sinyal yollarının ana bileşenlerini gösteren model.

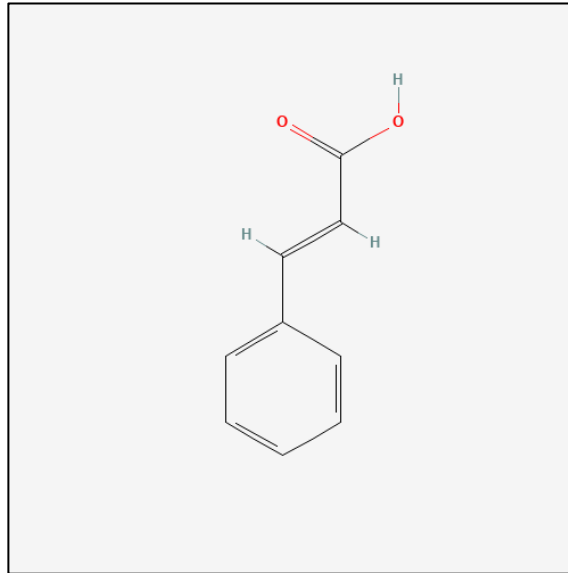
Genellikle, pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein düzenleyicileri arasındaki denge, bir hücrenin apoptoza girip girmediğini belirlemek için kritik bir anahtar noktadır [Wong, 2011]. Aynı zamanda DNA hasarının onarımında görevli proteinler (örnek olarak PARP), PI3K/AKT gibi hücresel proliferasyonu ilgilendiren yollar üzerinden apoptozu indükleyebilir [Brown et al., 2017]. Prekanseroz lezyonlarda DNA hasarı sonucu apoptozun indüksiyonu potansiyel olarak zararlı hücreleri çıkarabilir ve böylece tümör büyümesini engelleyebilir. Bu ölüm sürecinin düzensizliği, kontrolsüz hücre çoğalması, kanserin gelişimi ve ilerlemesi ve ilaç tedavilerine karşı kanser direnci ile ilişkilidir. Bu nedenle, apoptozun düzensizleşmesi kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilir [Pistritto et al., 2016].

2.3. Sinnamik ve Kafeik Asit

Polifenoller, antikanser ilaçlarının keşfi için potansiyel bileşenlerdir. Günümüzde birçok laboratuvar doğal polifenoller ve bunların insan üzerindeki antikanser etkileri üzerinde çalışmaktadır [Selvakumar et al., 2020]. Bu bileşikler

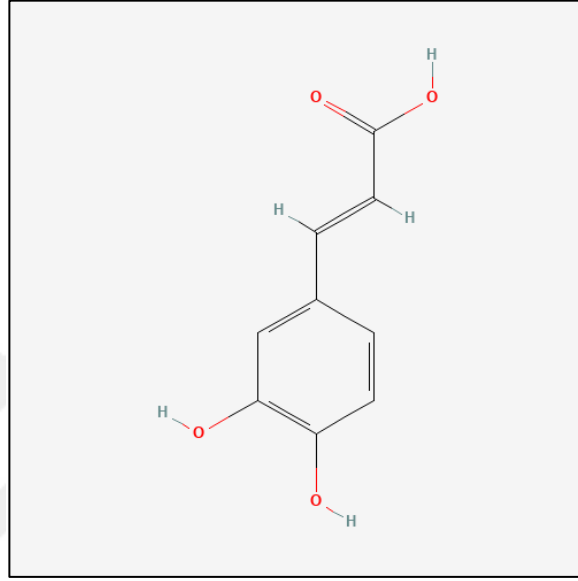
farklı meyvelerden (çilek, üzüm, elma, portakal vb.), sebzelerden (örneğin kırmızı biber, soğan, maydanoz vb.), içeceklerden (çay, kahve, kırmızı şarap vb.) ve yenilebilir bitkilerden izole edilirler [Hazafa et al., 2020]. Diyetimizde de bulunan doğal polifenol bileşikleri, hücre döngüsü sinyalleşmesinin modülasyonu, kanser önleyici maddelerin uzaklaştırılması, antioksidan enzim aktivitesi, apoptoz ve hücre döngüsünün durdurulması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla antikanser etkiler göstermektedirler [Kopustinskiene et al., 2020]. Polifenollerin ve flavonoidlerin kanser hücrelerinin proliferasyonunda anahtar görevleri olan MAPK ve PI3K yollarını önemli ölçüde etkileyebileceği [Maleki et al., 2019] ve aynı zamanda polifenollerin HCT-116 kolon kanseri ve H1299 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi farklı kanser çeşitlerinde apoptozu indükleyebilecekleri belirtilmiştir [Musial et al., 2020].

Sinamik asit (CINN) ya da [(E)-3-fenilprop-2-enoik asit], (Şekil. 2.5) ve bir CINN türevi olan kafeik asit (CA) ya da [(E)-3-(3,4-dihidroksifenil) prop-2-enoik asit], (Şekil. 2.6) bitki kaynaklı fenolik asitlerdir [Web 3, 2022; Web 4, 2022]. Fenolik asitler, insan diyetinde bulunan başlıca temel besin olmayan maddelerdir. CINN ve türevleri meyveler, sebzeler ve kepekli tahıllar gibi bitki temelli gıdalarda bol miktarda bulunur. Bunlara örnek olarak CINN tarçın, turuncgiller, üzüm, çay, kakao, ıspanak ve kerevizde bulunurken; CA kahve, kekik, tatlı patates, enginar ve adaçayında bulunur [Anantharaju et al., 2016; Adisakwattana, 2017].



Şekil. 2.5: CINN molekülünün iki boyutlu yapısı.

CINN ve CA kanser araştırmaları kapsamında birçok çalışmada kullanılmıştır. CINN; HT-44 melanoma hücre hattında S fazındaki hücrelerinin sayısını azaltarak hücre canlılığını azaltmıştır [Niero and Machado-Santelli, 2013], HT-29 hücrelerinin büyümesini engellemekle kalmayıp aynı zamanda kök hücre benzeri kolon kanseri hücrelerinin popülasyonunda dramatik bir azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir [Soltanian et al., 2018].



şekil. 2.6: CA molekülünün iki boyutlu yapısı.

CA; MCF-7 meme kanseri hücre hattı [Rezaei-Seresht et al., 2019], SK-Mel-28 insan melanoma hücre hattı [Pelinson et al., 2019], HT-29 kolorektal karsinoma hücre hattı ve HT-1080 fibrosarkoma hücrelerinin hücre canlılığını, apoptoz mekanizmasını indükleyerek azaltmıştır [Rajendra Prasad et al., 2011; Murad et al., 2015], hepatokarsinoma hücrelerinde reaktif oksijen türlerini azalttığı ve anjiyogenezi baskıladığı gösterilmiştir [Espíndola et al., 2019]. CA'nın PI3K/AKT ve MAPK/ERK yolakları gibi hayatta kalma ve proliferasyon kaskadlarını aşağı modüle ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, CA'nın bu sinyal yollarını nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir [Anantharaju vd., 2016].

2.4. Tedavi Yöntemleri

Kanser çalışmalarının temel dayanağı, tümöre özgü moleküler anormalliklerin doğru, etkili ve potansiyel olarak daha az toksik tedaviler ile hedeflenebilmesidir. Kapsamlı klinik öncesi çalışma ve farmakolojik olarak hedeflenebilecek yapıların tespiti oldukça önemlidir [Zugazagoitia et al., 2016].

MM için henüz tam anlamıyla iyileştirici bir tedavi bulunmamaktadır. Cerrahi seçeneğinin tartışmalı olduğu belirtilmekle birlikte, erken evre hastalığı olan ve fonksiyonel durumu iyi olan hastalarla sınırlıdır. Sistemik tedavi seçenekleri arasında kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik tedavi bulunur. Bu tedavi yöntemleri ayrı ayrı veya kombinasyon tedavisi olarak uygulanmaktadır. Bu bağlamda, yeni terapötik ajanlar araştırılmaktadır ve gelecekte MM için daha fazla tedavi seçeneği sağlanabileceği hedeflenmektedir [Bibby et al., 2016].

2.4.1. Kemoterapi

Kemoterapi, MM'nin tedavisi yolunda önemli bir rol oynamaktadır. Standart sistemik tedavi, sisplatin ve pemetreksed veya sisplatin ve raltitreksed kombinasyonundan oluşur [de Gooijer et al., 2018]. Bazı özel durumlarda örneğin yaşlı hastalarda karboplatin, sisplatine geçerli bir alternatif olarak kullanılabilir. Sisplatin, DNA replikasyonuna müdahale ederken, pemetreksed, nükleik asit sentezine müdahale ederek çalışan bir folat antimetabolittir. Sisplatin ve pemetreksed kombinasyonu klinik çalışmaların çoğunda kullanılmakta olup, ayrıca üçlü kombine tedavi olarak cerrahi ve radyoterapi ile de kombine edilebilmektedir [Berzenji and Van Schil, 2018].

2.4.2. Radyoterapi

Radyoterapi, MM'de iki amaç ile kullanılır; bunlardan biri semptomları tedavi etmek için palyatif bir önlem olarak, bir diğeri ise üçlü kombinasyon tedavisi bağlamında cerrahi ve kemoterapiye bir adjuvan olması amacı ile kullanılabilir. Radyoterapinin hedefi çevredeki normal dokuya minimum hasar vererek tümörü kontrol altında tutabilmektir [Abdel-Rahman, 2017]. Palyatif amaç ile uygulanan

radyoterapinin tümör hacmini azaltabileceği ve özellikle göğüs duvarı invazyonu, sinir kökü tutulumu veya ağrılı kutanöz metastazlar bağlamında semptomları hafifletebileceği gösterilmiştir [MacLeod et al., 2015].

2.4.3. Cerrahi

MM'de cerrahi konusunda iki yaklaşım bulunmaktadır, tüm görünür hastalığın radikal olarak çıkarılması veya daha konservatif, doku koruyucu, hacim giderme prosedürü uygulanmaktadır. Radikal olan seçenek, 1976 yılında Butchard ve arkadaşlarının öncülüğünde başlamış olup bu yöntemde akciğer, plevra, perikard ve diyaframın çıkarılması yoluyla tüm makroskobik tümörün çıkarılarak yok edilmesini amaçlayan bir operasyon olan ekstraplevral pnömonektomidir. Bu yol ile sağkalımın arttırıldığını bildirilirken, mortalite ve komplikasyon oranlarının yüksek olmasına dikkat çekilmektedir [Butchard et al., 1976]. Günümüzde, gelişen cerrahi teknikler ile bu yöntem hala kullanılmaktadır ve dolayısıyla geçmişe oranla daha yüksek başarıya sahiptir. Cerrahi için uygun hastaların seçimi oldukça sıklıdır ve her hasta cerrahi yöntem ile tedavi edilemez [Opitz and Furrer, 2020].

2.4.4. İmmünoterapi

İmmünoterapi, malign tümörlerin tedavisinde giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Sitotoksik T-lenfosit antijeni 4 (CTLA-4) veya programlanmış hücre ölüm proteini-1 (PD-1) ve ligandı (PD-L1) gibi bağışıklık kontrol noktalarını inhibe ederek etki eder. Geçmişten günümüze immünoterapinin gelişmesi ve yapılan araştırmalar sayesinde MM'de sağ kalımın arttığı gözlemlenmiştir [Menis et al., 2021]. Şimdiye kadar tamamlanan erken klinik çalışmalardan umut verici verilerin olduğu ve Checkmate 743'ün olumlu sonuçlarının artması beklenmektedir. Ekim 2020'de FDA, daha önce tedavi görmemiş rezektabl olmayan MM vakalarının birinci basamak tedavisi için Nivolumab ve ipilimumab kombinasyonunu (Checkmate 743) onaylamış bulunmaktadır [Liao et al., 2021].

2.4.5. Üçlü Kombinasyon (Modalite) Tedavisi

MM için üçlü kombinasyon tedavisi, indüksiyon kemoterapisini takiben ekstraplevral pnömonektomi ve ardından hemitoraks radyoterapisinden oluşur. Bu kombinasyon tedavisinin uygulandığı hastalar ile kombinasyon tedavisi almamış hastalar arasında yapılan değerlendirmede, tedavi uygulanan hastaların sağ kalım oranlarının önemli bir şekilde yükseldiği gösterilmiştir [Kapeles et al., 2018]. MM'nin üçlü kombinasyon tedavisinin agresif bir tedavi stratejisi olduğunu, cerrahinin büyük çapta olmasına ve hemitoraks radyoterapisinin karmaşıklığına rağmen olumlu sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda MM tedavisinde radyoterapinin kesin rolü hala tanımlanmasa da artan kanıtlar ile MM'nin radyoterapi tedavisine duyarlı olduğu düşünülmektedir [Mummudi et al., 2020].

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Hücre Kültür Uygulamaları

Bu çalışmada kullanılan kanser olmayan mezotelyal hücreler (MeT-5A, CRL-9444) ATCC'den temin edilmiştir. MM hücreleri (SPC212 ve SPC111) Fribourg Üniversitesi, Histoloji ve Genel Embriyoloji Enstitüsü, İsviçre'den temin edilmiştir. MeT-5A hücre hattı, kanser olmayan bireylerden alınan plevral sıvıdan elde edilmiştir. pRSV-T plazmidi transfekte edilerek klonlanan bu hücrelerin morfolojileri epitelyal olarak tanımlanmıştır. SPC212 hücre hattı, asbeste maruz kaldığı bilinen 47 yaşında bir kadın MM hastasının, tedavi uygulanmadan önce göğüs boşluğundan elde edilen bifazik tümör hücreleridir. Hücre morfolojisi epiteloid/mezenkimal olarak belirtilmiştir. SPC111 hücre hattı ise asbeste maruz kaldığı bilinen 55 yaşında erkek bir MM hastasının, tedavi uygulanmadan önce plevral efüzyonundan elde edilen hücrelerdir. Hücre morfolojisi epiteloid/mezenkimal olarak belirtilmiştir. Hücrelerin büyümeleri için kullanılan besi yerinde, MeT-5A hücreleri M199 (M5017, Sigma Aldrich), %10 FBS (Fetal Sığır Serum), (10270106, Gibco), %1 penisilin-streptomisin (15140122, Gibco), sodyum bikarbonat (S8875, Sigma Aldrich), %0,4 L-Glutamin (G7513, Sigma Aldrich), 400 nM hidrokortizon (H0888, Sigma Aldrich), 20 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit), (H0891, Sigma Aldrich), 3,3 nM EGF (E9644, Sigma Aldrich) ve 870 nM insülin (I6634, Sigma Aldrich) ilavesi ile büyütülmüştür. Besi yerinde SPC212 ve SPC111 hücreleri RPMI1640 (R6504, Sigma Aldrich), %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, sodyum bikarbonat ilavesiyle büyütülmüşlerdir. Kullanılan tüm hücreler 37°C'de ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilerek büyütülmüşlerdir.

3.1.1. CINN ve CA Uygulamaları

Toz halindeki CINN (800235, Sigma Aldrich) ve CA (C0625, Sigma Aldrich) etanolde (070616185001, TEKKİM) çözülerek, sırasıyla 600 mM ve 200 mM konsantrasyonlarında ana stoklar hazırlanmıştır. Deneylerin tümünde maddeler taze hazırlanmıştır. CINN ve CA maddelerinin farklı konsantrasyonları en az üçlü tekrarlar

şeklinde uygulanırken, kontrol grubu hücrelerine herhangi bir madde uygulanmadan aynı şekilde diğer işlemler gerçekleştirilmiştir. Deneylerde pozitif kontrol olarak 50 nM konsantrasyonda kullanılan doksorubisin (L01DB01), Saba İlaç'tan temin edilmiştir.

3.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Deneylerde kullanılan tüm hücreler 96 kuyulu petrilere, her kuyuya eşit hücre sayısı (5×10^3 hücre/kuyu) olacak şekilde ekilmiştir. Madde eklenmeden önce besi yeri yenilenerek maddeler eklenmiştir, bu işlem hücre ekiminden 24 saat sonra gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığının ölçülebilmesi için madde eklemelerinden 72 saat sonra eski besi yeri uzaklaştırılmıştır. Tozdan 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT'den (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür), (M2128, Sigma Aldrich) besi yeri ile %20 seyreltilerek bir ara çözelti hazırlanmıştır. Kuyulara hazırlanan ara çözelti eklenmiştir ve 2 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem kültür ortamında ve karanlıkta gerçekleştirilmiştir. 2 saatin sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılarak her kuyuya dimetil sülfoksit (DMSO), (116743.1000, MERCK) eklendikten sonra karanlıkta 10 dakika bekletilmiştir. Kolorimetrik ölçüm Varioskan Flash (Thermo-Fisher Scientific) cihazı kullanılarak 570 nm dalga boyunda yapılmıştır. Ortalamalar ve standart sapmalar Microsoft Excel programı kullanılarak, grafikler ve istatistiksel hesaplamalar ise ANOVA ve Bonferroni testleri ile GraphPad Prism 8.3.0 programında yapılmıştır.

3.3. Hücre Göçünün Analizi

Deneylerde kullanılan SPC111 ve SPC212 hücreleri 96 kuyulu petrilere, her kuyuya eşit hücre sayısı (25×10^3 hücre/kuyu) olacak şekilde ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra, besi yeri uzaklaştırılmış ve yaranın oluşturulması için 10µL'lik pipet ucu ile kuyu boyunca bir düz bir çizgi şeklinde yara açılmıştır. Daha sonra kuyular 1X fosfat tamponlu salin (PBS), (pH:7,4), (NaCl (S3014, Sigma Aldrich), KCl (P5405, Sigma Aldrich), Na_2HPO_4 (S3264, Sigma Aldrich), KH_2PO_4 (P9791, Sigma Aldrich)) ile yıkanmıştır. Kuyulara 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında CA ve %1 FBS içeren besi yeri eklenmiştir. Pozitif kontrol

olarak 50 nM doksorubisin kullanılmıştır. Madde uygulamasından sonra, yara alanı 5X büyütmede 0, 12, 24 ve 48. saatlerde ters (inverted) mikroskop (Leica DM IL LED) ve LAS V4.6 programı ile görüntülenmiştir. Her örnek için elde edilen görüntüler, ImageJ yazılımı ve bu yazılımın “MRI_Wound_Healing_Tool.ijm” eklentisi ile nicel olarak analiz edilmiş ve alınan görüntülerdeki yara alanı (hücresiz alan) hesaplanmıştır. Hücrelerin göç oranı veya yaranın kapanma yüzdesi Formül 3.1 [Grada et al., 2017] ile hesaplanmıştır.

$$Yara\ İyileşmesi\ \% = \left[\frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \right] \times 100\% \quad (3.1)$$

$A_{t=0h}$ yara oluşturulduktan hemen sonra ölçülen yara alanıdır ($t=0h$),

$A_{t=\Delta h}$ yara oluşturulduktan h saat sonra ölçülen yaranın alanıdır.

3.4. Hücre Döngüsü Analizi

Her iki MM hücre hattı hücreleri 12 kuyulu petrilere, eşit hücre (2×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde ekildikten sonra 24 saat inkübe edilmiş, sonrasında serum içermeyen besi yerinde 24 saat bırakılarak hücre senkronizasyonu sağlanmıştır. Takibinde serumlu besi yeri ile 25, 50, 100 μ M konsantrasyonlarında CA uygulanarak bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Fiksasyon aşaması için öncelikle, kuyulardaki besiyeri ependorflara toplanarak 1X PBS ile kuyular yıkanmıştır. Kuyulara tripsin (25200056, Thermo-Fisher Scientific) eklenerek 2-3 dakika hücrelerin petriden ayrılması beklenmiştir. Tripsini inhibe etmek amacıyla üzerine besi yeri eklenmiştir ve kuyu içeriğinin tamamı ependorflara toplanmıştır. Ependorflar 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj (MiniSpin, Eppendorf) edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Pellet, 1X PBS ile yavaşça çözülmüş ve aynı ayarlar kullanılarak tekrar santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Buzdaki %70’lik soğuk etanol ile pellet yavaşça çözülmüştür. Daha sonra örnekler +4 °C’de 30 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Alkolün uzaklaştırılabilmesi için örnekler +4 °C’de 1000 g’de 5 dakika santrifüj edilir ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Örnekler 1X PBS ile çözülerek aynı ayarlar kullanılarak santrifüj edilmiş, sonrasında PBS uzaklaştırılmıştır ve bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Örneklerle boya içeren çalışma solüsyonu (1X PBS içerisinde

PI ve %10 Triton X-100 (T8787, Sigma Aldrich), ile hazırlanan ana stoğa, RNaz (10109134001, Roche) eklenerek çalışma solüsyonu hazırlanmıştır) eklenmiş ve karanlık bir ortam sağlanması için örneklerin üzeri folyo ile sarılmıştır. Daha sonra örnekler 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler oda sıcaklığında 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek boya uzaklaştırılmıştır. Örnekler oda sıcaklığındaki 1X PBS’de çözülerek Accuri C6 (BD Bioscience) akım sitometrisi cihazında yapılacak ölçüm için hazır hale getirilmiştir. Cihazda alınan ölçümler BD Accuri C6 Software (BD Bioscience) ile hesaplanmıştır.

3.5. Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi

Hücre ölümünün analizi için iki tip floresan boyama tekniği kullanılarak, madde uygulaması sonrasında canlı ve ölü hücreler morfolojik olarak ve nicel olarak belirlenmiştir. Bu deneylerde, hücreler floresan boyalar olan akridin turuncusu (AO), (235474, Sigma Aldrich), etidyum bromür (EtBr), (E7637, Sigma Aldrich), 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-karboksamidin (DAPI), (4083, Cell Signaling Technology), propidyum iyodür (PI), (P4170, Sigma Aldrich) kullanılarak ve ikili boyama yöntemi (AO/EtBr; DAPI/PI) uygulanarak görüntülenmiştir. Bu boyamalar ile boyanan hücrelerin morfolojileri ve hücre ölüm oranları sayısal olarak hesaplanmıştır.

3.5.1. AO/EtBr

Bu deneyde 96 kuyulu petrilere ekilen tüm hücreler (1×10^4 hücre/kuyu) 24 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Ekim işleminden bir gün sonra eski besi yeri uzaklaştırılıp 25, 50, 100 μ M konsantrasyonlarında CA uygulanarak, 24 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 50 nM doksorubisin kullanılmıştır. Toz AO ve EtBr’den 1:1 oranda 1X PBS içerisinde hazırlanan AO/EtBr boyası, karanlık ortamda, her kuyuya besi yeri içerisine eklenmiştir. Örnekler eklenen boya, 15 saniye bekletildikten sonra uzaklaştırılarak, ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) cihazında yeşil ve kırmızı floresan kanalları kullanılarak 20x büyütme (ölçek çubuğu, 100 μ m) ile görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Alınan görüntülerde hücrelerin morfolojileri ve sayısı ImageJ [Schneider et al., 2012] programı ile belirlenmiştir. Ölü / Toplam hücre oranı

Microsoft Excel programı; grafikler ve istatistiksel analizler GraphPad Prism 8.3.0 programıyla yapılmıştır.

3.5.2. DAPI/PI

Bu deneyler için kullanılan MM hücre sayıları ve madde uygulamaları AO/EtBr deneylerinde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Madde uygulamasından sonra, kuyulardaki besi yeri çekilerek üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlanan ve 1X PBS içerisinde seyreltilen, son konsantrasyonu 25 µg/ml olan PI kuyulara eklenmiştir. PI, 10 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra uzaklaştırılmış ve kuyular 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra fiksasyon için %4'lük formaldehit (7041, JT Baker) kuyulara eklenmiş ve 5 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra formaldehit uzaklaştırılmış ve kuyular 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlanan ve 1X PBS içerisinde seyreltilen, son konsantrasyonu 1 µg/ml olan DAPI kuyulara eklenmiştir. DAPI, 10 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra uzaklaştırılmış ve kuyular 1X PBS ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra örnekleri görüntülemek için ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) cihazında mavi ve kırmızı floresan kanalları kullanılmıştır. DAPI/PI görüntüleri, AO/EtBr görüntüleri ile aynı şekilde 20x büyütme ile görüntülenmiş fakat farklı olarak, görüntüler cihazda bulunan maksimum dijital yakınlaştırma ayarı ile yakınlaştırılarak (ölçek çubuğu, 25 µm) alınmıştır. Elde edilen görüntülerin düzenlenmesi ve hücrelerin morfolojilerinin belirlenmesi için ImageJ programı kullanılmıştır.

3.6. Protein Analizleri

Bu analizlerde, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve hücre ölümünde rol oynayan anahtar proteinlerin analizleri yapılmıştır. Uygulanan işlemler protein izolasyonları, SDS/PAGE, western blot ve immün tespit adımları ile ilerleyerek yapılmış ve sonuçlar alınarak değerlendirilmiştir.

3.6.1. Protein İzolasyonları

Deneyler için petrilere ekilen hücreler (12×10^5 hücre/petri) 24 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. Ektikten 24 saat sonra eski besi yeri uzaklaştırılıp 25, 50, 100 μM konsantrasyonlarında CA uygulanmıştır ve 24 saat sonra izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzleyen işlemler buzda uygulanmıştır. Petrillerdeki hücreler soğuk 1X PBS ile yıkanarak ve hücre kazıyıcı yardımı ile kazınarak toplanmış, santrifüj ile çöktürülmüş, üst faz atılarak pellet, taze hazırlanmış %1 proteaz-fosfataz inhibitörü (1862495, Thermo-Fisher Scientific) içeren liziz tamponu (150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 (M4880, Sigma Aldrich), %10 gliserol (G5516, Sigma Aldrich), 20 mM Tris Base (pH:8), (T1503, Sigma Aldrich), %1 Triton X-100 (T8787, Sigma Aldrich), %10 SDS (194831, MP)) kullanılarak çözülmüştür ve pipet ucu veya şırınga yardımı ile pipetaj yapılarak hücreler patlatılmıştır. Elde edilen hücre karışımı ependorflara alınarak $+4^\circ\text{C}$ 'de 14000 g/rcf 'te 10 dakika santrifüj (Micro Star 17R, VWR) edilmiştir. Üst fazın tamamı yeni ependorflara alınmış ve protein konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için lizatlarından bikinkoninik asit testi (BCA) için ayrılarak kalan proteinler -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Protein konsantrasyonları Pierce BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo-Fisher Scientific) ile Varioskan Flash (Thermo-Fisher Scientific) cihazı kullanılarak 562 nm'de alınan absorbans değerleri ölçülerek belirlenmiştir. Standartların absorbans değeri kullanılarak standart grafik çizilmiş ve doğrusal grafiğin formülü ile de R^2 değeri hesaplanmıştır. Denklemden ilgili yere absorbans değerleri yazılarak protein lizatlarının konsantrasyonları $\mu\text{g/ml}$ cinsinden hesaplanmıştır.

3.6.2. SDS-PAGE ve Western Blotlama

Hücrelere uygulanan maddelerin, sinyal yolları ve apoptotik yollarla rol alan anahtar proteinlere etkilerini analiz etmek amacıyla, total protein lizatı 5X örnek yükleme boyası (0,2 M Tris-HCl (pH: 6,8), (HCl, 07102, Sigma Aldrich), %8 SDS, %0,4 bromofenol mavisi (B0126, Sigma Aldrich), %40 gliserol, %20 β -merkaptoetanol, (A1108, Applichem)) ile karıştırılıp, ısı bloğu (Digital Heat Block, VWR) yardımı ile örnekler 100°C 'de 5 dakika kaynatılmıştır. Tank (Mini Protean, Bio-Rad) içerisine yeterli seviyeye kadar 1X elektroforez tamponu (5X stok

tampondan seyreltilerek elde edilmiştir, 25 mM Tris Base, 0,19 M glisin (808822, MP), %0,1 (w/v) SDS) eklenmiştir ve jel tankın içerisine yerleştirilmiştir. Örnekler daha önceden hazırlanan %10-12 yoğunluktaki iki fazlı dikey jelin (Yığılma jeli; %4,5 Bis-akrilamid (%40 w/v), (A4989, Applichem), 0,375 M Tris-HCl (0,5 M, pH: 6.8), %0,10 SDS (%10 w/v), %0,05 APS (%10 w/v), (A2941, Applichem), %0,10 TEMED, (T7024 Sigma Aldrich) ve Ayrılma jeli; %10 Bis-akrilamid (%40 w/v), 0,375 M Tris-HCl (1,5 M, pH: 8.8), %0,10 SDS (%10 w/v), %0,05 APS (%10 w/v), %0,10 TEMED) kuyularına yüklenmiştir buna ek olarak, jelde bantlar halinde ayrılacak proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenebilmesi için jele marker (26619, Thermo-Fisher Scientific) yüklenmiştir. Elektroforez işlemi başlatılmış ve proteinlerin hizalanması için örnekler yığılma jelinin sonuna kadar yürütülmüştür. Örnekler aynı hizaya geldiklerinde güç artırılarak bantların tam olarak ayrılması sağlanmıştır. Dikey jel elektroforezi sonunda, jelde bantlar şeklinde ayrılan proteinler Amersham Hybond P 0.45 PVDF membrana (GE10600023, GE Healthcare) aktarılmak üzere transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi tankta uygun aparatlar kullanılarak ve 1X transfer tamponu (10X stok tampondan seyreltilerek ve daha sonra %20 metanol (32213, Sigma Aldrich) eklenerek hazırlanmıştır, 250 mM Tris Base, 0,19 M glisin) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra membran %5 (w/v) yağsız süt tozu (A0830, Applichem) içeren 1X Tris tamponlu salin (10X stok tampondan seyreltilerek hazırlanmıştır, 200 mM Tris-HCl (pH:7.4), 1,5 M NaCl) ve %0,1'lik Tween 20 (A4979, Applichem) karışımı (TBS-T) içerisinde, 1 saat çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6.3. İmmün Belirleme

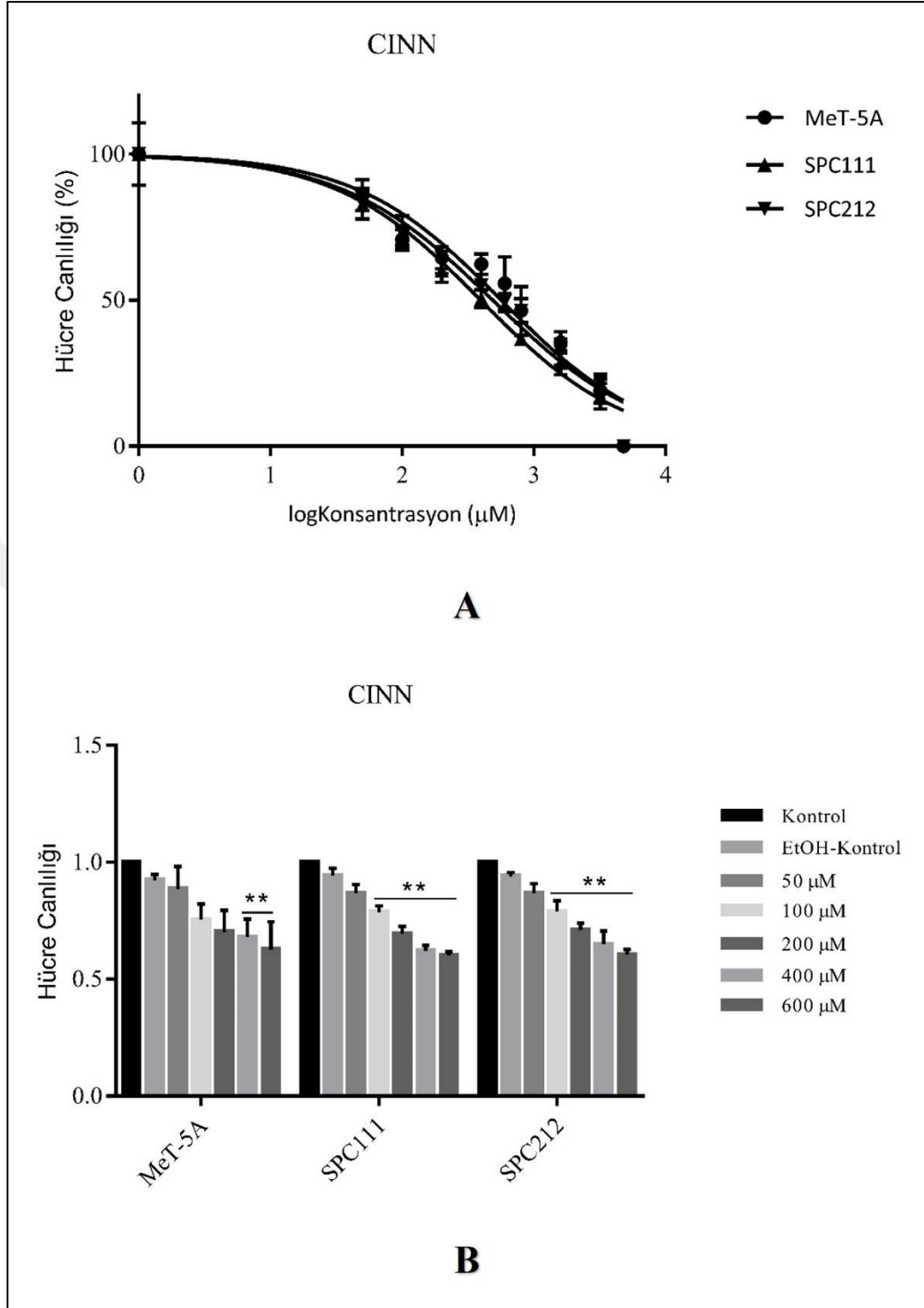
Membran, 1X TBS-T ile üç kez 10'ar dakika çalkalanarak yıkandıktan sonra %5'lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek hazırlanan birincil antikor ile soğuk odada gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 1X TBS-T ile 3 kez yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Membran, %5'lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek hazırlanan yaban turpu peroksidaz (HRP)-konjuge ikincil antikor ile 2 saat inkübe edilmiştir. İkincil antikor ile inkübasyonun ardından 1X TBS-T ile 3 kez yıkanan membran, görüntüleme işleminden önce Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate kiti (32132, Thermo-Fisher Scientific)

kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde muamele edilmiştir. Membran, ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) cihazı ile görüntülenmiş ve elde edilen protein bantlarının yoğunluğu ve protein miktarları Image Lab 6.0 (Bio-Rad) programı ile analiz edilerek protein seviyelerindeki değişimler karşılaştırılmıştır. Deneylerde hücre proliferasyonunu, sağ kalımını ve stresini belirlemek için; p-ERK1/2 (8544, Cell Signaling Technology), t-ERK1/2 (9107, Cell Signaling Technology), p-AKT (4060, Cell Signaling Technology), t-AKT (4691, Cell Signaling Technology), p-STAT3 (9145, Cell Signaling Technology), t-STAT3 (12640, Cell Signaling Technology), p21 (2947, Cell Signaling Technology), p27 (3686, Cell Signaling Technology), p-p53 (9286, Cell Signaling Technology), t-p53 (9282, Cell Signaling Technology), PARP (9532, Cell Signaling Technology), Bax (5023, Cell Signaling Technology) proteinlerinin birincil antikorları ve ilgili ikincil antikorlar olan anti-rabbit (7074, Cell Signaling Technology), anti-mouse (7076, Cell Signaling Technology) ve yürütme kontrol olarak siklofilin B (PA1-027A, Thermo-Fisher Scientific) kullanılmıştır.

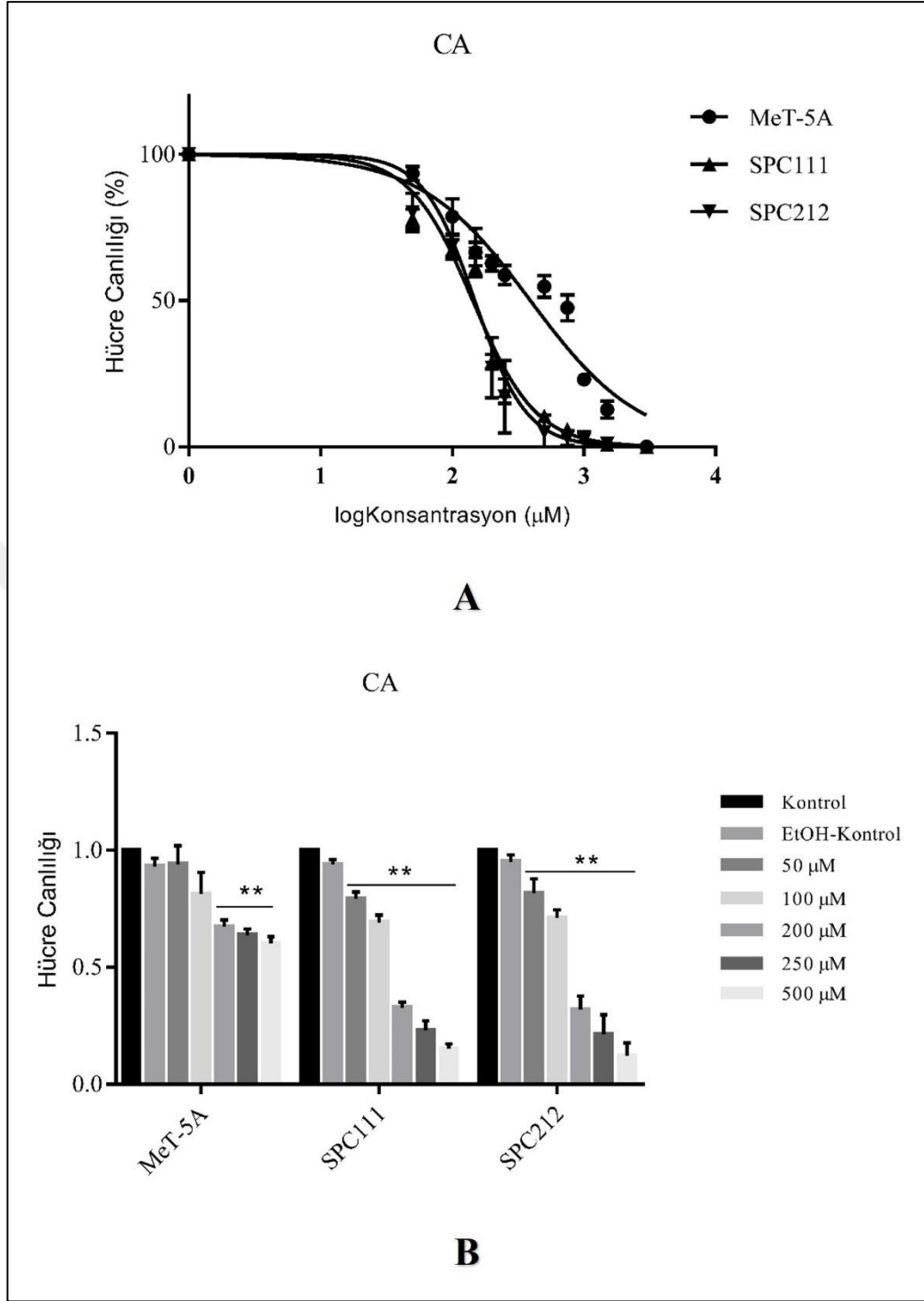
4. SONUÇLAR

4.1. CINN ve CA'nın Hücre Canlılığına Etkisi

CINN ve CA'nın hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi için 0-5000 μM CINN ve 0-3000 μM CA uygulamaları kanser olmayan mezotelyal ve iki farklı MM kanser hücre modelinde gerçekleştirilmiştir. Absorbansa göre belirlenen MTT değerlerinin ortalamaları alınarak standart sapmaları GraphPad Prism 8.3.0 programında, hücreleri %50 inhibe eden konsantrasyon (IC_{50}) değerleri belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde CINN için 567 μM , 395,3 μM , 488,1 μM ve CA için 392,7 μM , 143,3 μM , 148,5 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1 (A) ve 4.2 (A)). Seçicilik indeksi (SI), sırasıyla SPC111 ve SPC212 hücrelerinde CINN için 1,43 ve 1,16 iken CA için 2,74 ve 2,64 olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.1 (B) ve 4.2 (B)'de CINN ve CA uygulaması yapılan tüm hücrelerin lineer grafikleri gösterilmektedir. Bu sonuçlar, CINN ve CA'nın, SPC111 ve SPC212 hücrelerine karşı Met-5A'ya oranla daha çok toksik olduğunu işaret etmektedir. Bu bulgular kapsamında IC_{50} ve SI değerleri ($\text{SI} > 2$) esas alınarak, sonraki detaylı analizlerimize sadece CA ile devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil. 4.1: CINN uygulamalarından sonra hücre canlılığının konsantrasyona bağlı inhibisyonu. MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücrelerine 0-600 μM CINN konsantrasyonları uygulanarak 72 saat incelenmiştir. IC_{50} değerleri MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücreleri için sırasıyla 567 μM , 395,3 μM , 488,1 μM olarak hesaplanmıştır (A). CINN uygulanan MeT-5A hücre sayısında azalış 400 μM üzerinde gerçekleşirken kanser hücrelerinde 100 μM konsantrasyondan itibaren gözlenmiştir (n=3, $^{**}p<0,01$), (B).

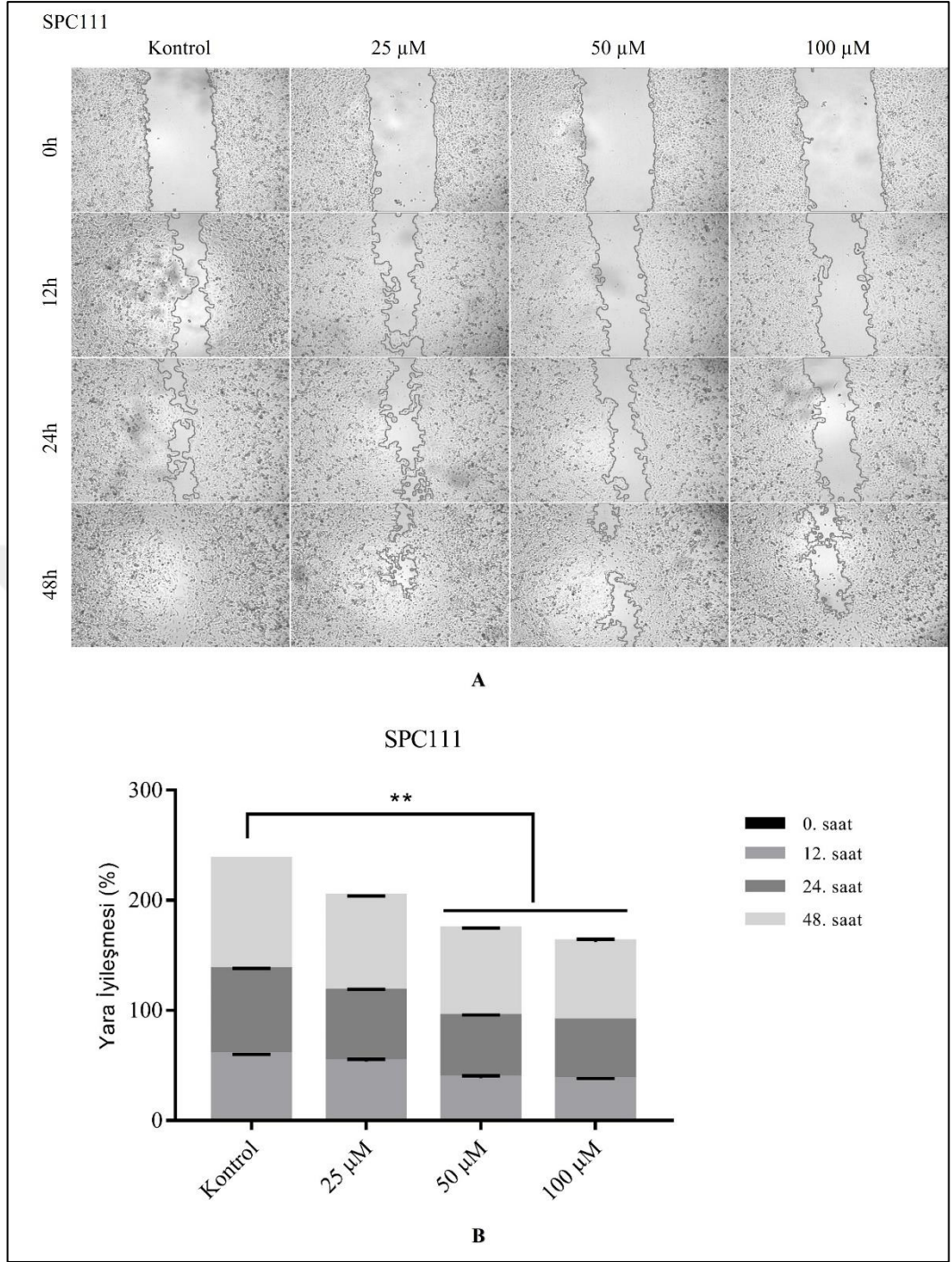


Şekil. 4.2: CA uygulamalarından sonra hücre canlılığının konsantrasyona bağlı inhibisyonu. MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücrelerine 0-500 μM CA konsantrasyonları uygulanarak 72 saat incelenmiştir. IC_{50} değerleri MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücreleri için sırasıyla 392,7 μM , 143,3 μM , 148,5 μM olarak hesaplanmıştır (A). CA uygulanan MeT-5A hücre sayısında azalış 200 μM üzerinde gerçekleşirken kanser hücrelerinde 50 μM konsantrasyondan itibaren gözlenmiştir (n=3, **p<0,01), (B).

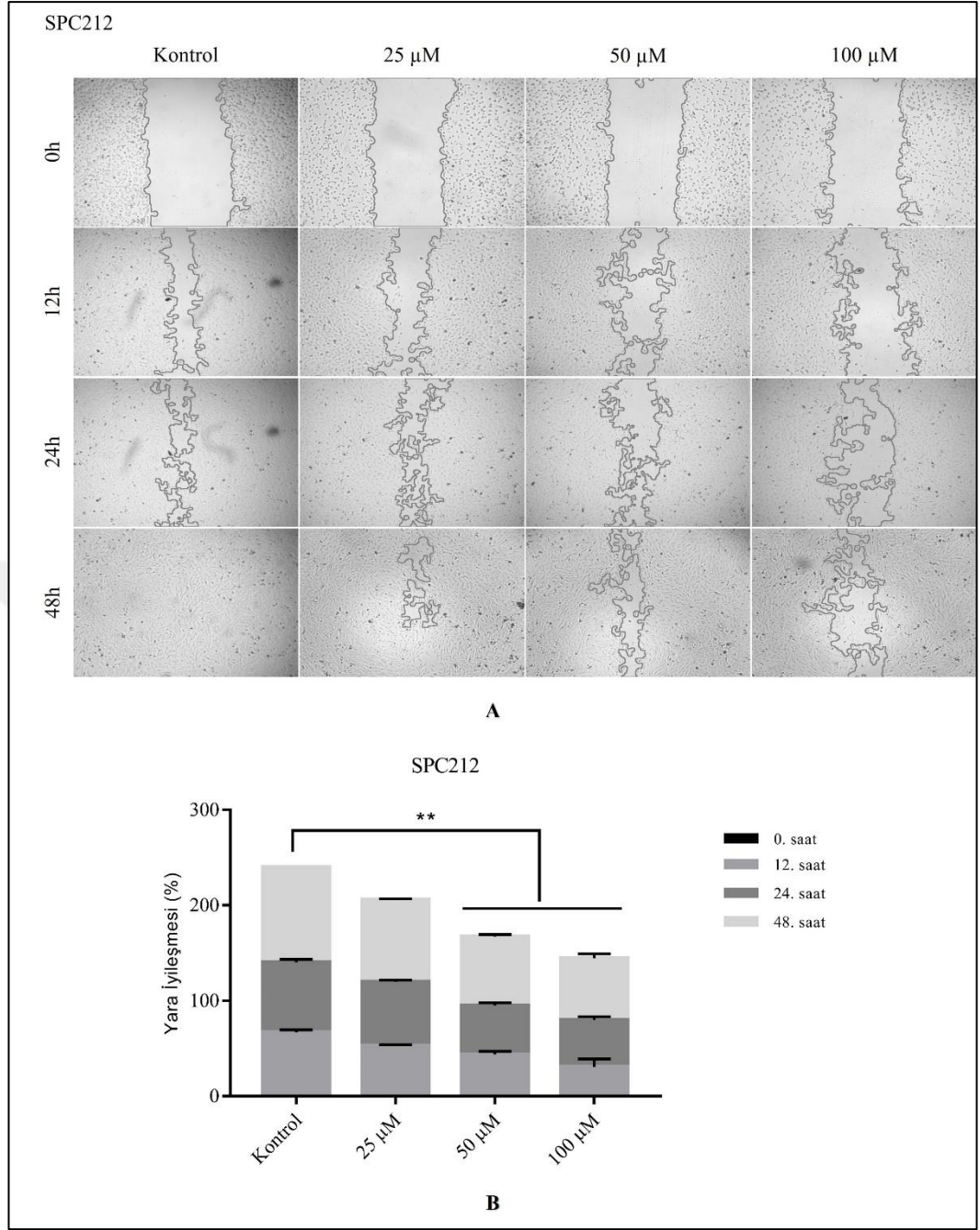
4.2. CA'nın Yara İyileşmesine Etkisi

IC₅₀ konsantrasyonu baz alınarak yara iyileşmesi deneyleri yapılmıştır. 0-100 µM konsantrasyon aralığında CA her iki kanser hücrelerine uygulanarak hücrelerin yara alanını kapanma oranları 0, 12, 24 ve 48. saatlerde inverted mikroskopta fotoğraflanarak ImageJ yazılımıyla nicel olarak analiz edilmiştir.

Şekil 4.3 (A) ve 4.4 (A)'da gösterildiği gibi, CA uygulanmayan hücrelerde yara iyileşmesi zamana bağlı olarak dinamik bir şekilde gözlenirken, 50 ve 100 µM CA uygulanan hücrelerde yara kapanması 48 saatin üzerinde gerçekleşmektedir. CA uygulanan kanser hücreleri, uygulanmayan hücrelerle karşılaştırıldığında konsantrasyona ve zamana bağlı olarak yara kapanmasını geciktirdiği belirlenmiştir. Şekil 4.3 (B) ve 4.4 (B)'de tek bir deney örnek olarak gösterilirken, grafiklerin istatistiksel hesaplamaları en az üç farklı deneyin ortalamaları alınarak GraphPad Prism 8.3.0 programında yapılmıştır.



Şekil. 4.3: CA'nın SPC111 hücrelerinde 0-48 saat aralığında hücresel yara kapanmasına etkisi. CA uygulaması (25, 50, 100 μ M) sonucu hücresel yara kapanmasının konsantrasyona ve zamana bağımlı gösterimi (5X büyütme), (A). Yara kapanma değerleri istatistiksel olarak hesaplanmıştır (n=3, **p<0,01), (B).



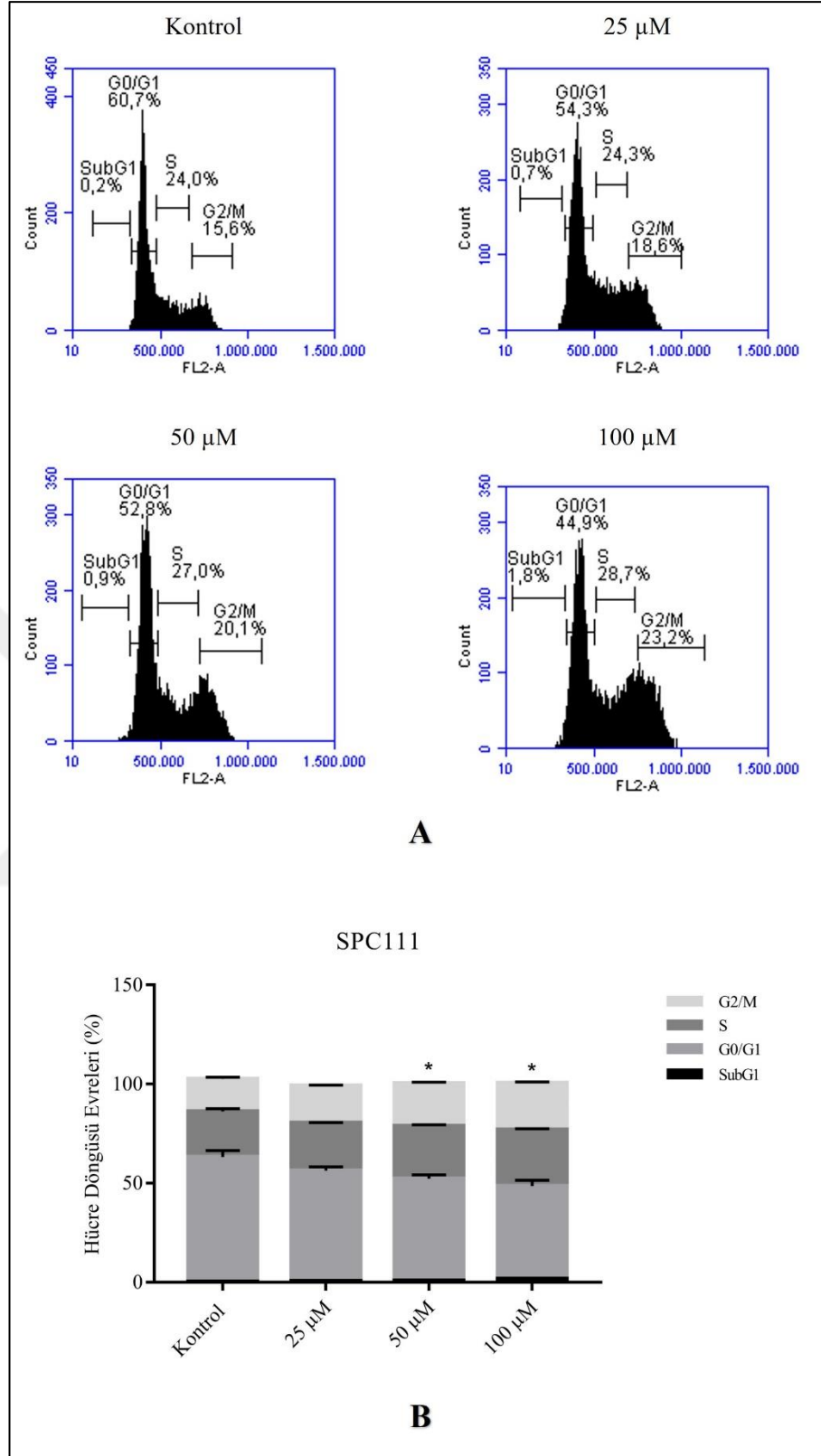
Şekil. 4.4: CA'nın SPC212 hücrelerinde 0-48 saat aralığında hücresel yara kapanmasına etkisi. CA uygulaması (25, 50, 100 μ M) sonucu hücresel yara kapanmasının konsantrasyona ve zamana bağımlı gösterimi (5X büyütme), (A). Yara kapanma değerleri istatistiksel olarak hesaplanmıştır (n=3, **p<0,01), (B).

4.3. CA'nın Hücre Döngüsüne Etkisi

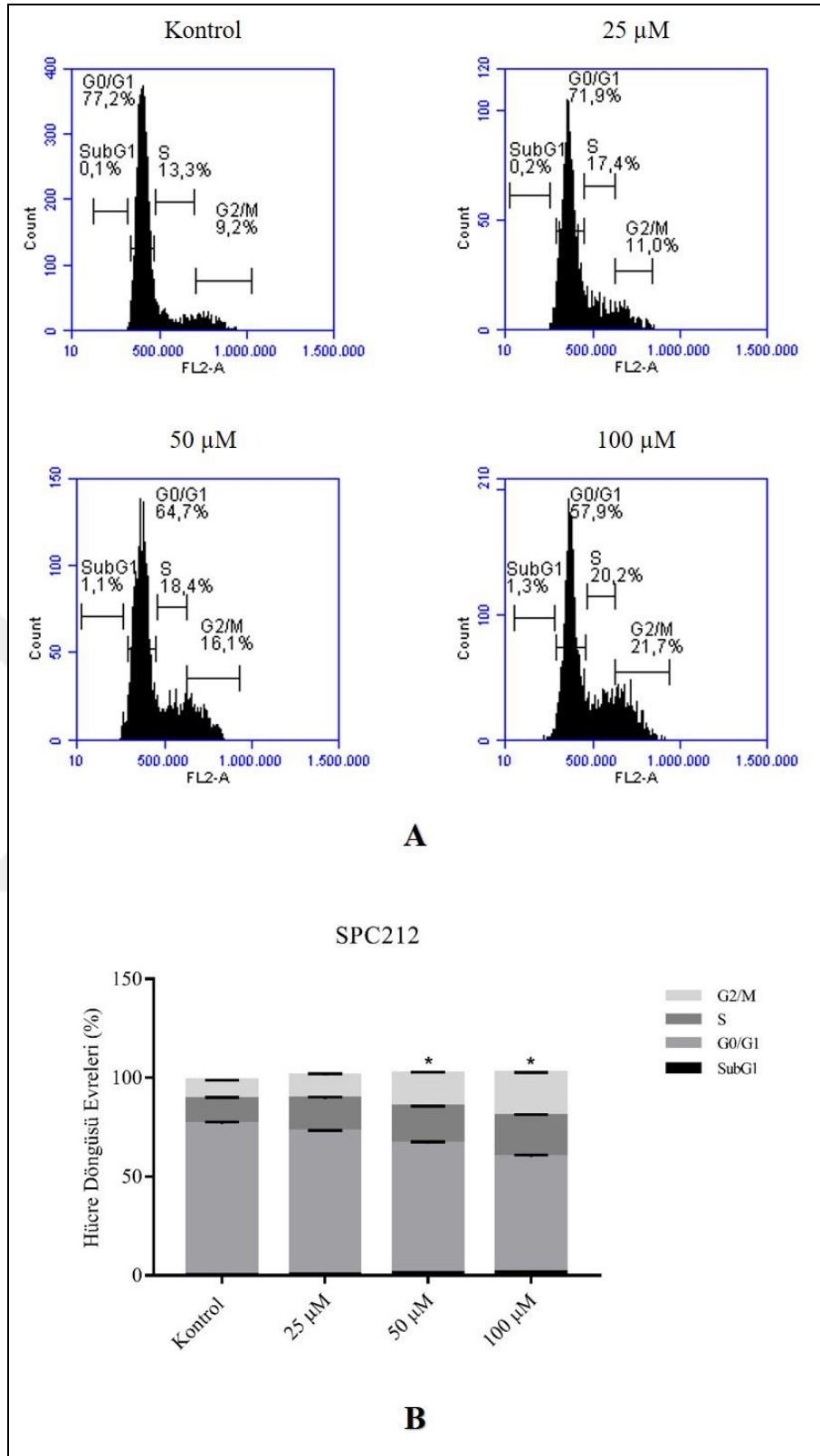
Belirlenen etkin konsantrasyonlar kapsamında bir sonraki adımda CA'nın hücre döngüsüne etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 0-100 μ M konsantrasyon aralığında CA uygulanarak hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra materyal ve metot kısmında

bahsedildiği gibi (Kısım 3.4) PI boyası ile boyanarak akım sitometrisinden elde edilen veriler değerlendirilmiş, hücree dđngüsünün fazları yüzde olarak hesaplanmıştır. şekil 4.5 (A) ve 4.6 (A)'da gösterildiği üzere; her iki hücrenin de 50 μ M konsantrasyondan itibaren G2/M fazında belirgin olarak tutuklandığı belirlenmiştir. şekil 4.5 (B) ve 4.6 (B)'de üç farklı deneyin ortalamaları alınarak istatistiksel değerler GraphPad Prism 8.3.0 programında hesaplanmıştır.





Şekil 4.5: CA'nın SPC111 hücre döngüsü üzerine etkisi. Hücre döngüsü profilinin konsantrasyona bağlı değişimi, PI boyama ve akış sitometrisi ile incelenmiştir (A). SPC111 hücrelerinde, hücre döngüsü aşamalarının yüzde olarak gösterimi (n=3, *p<0,05), (B).



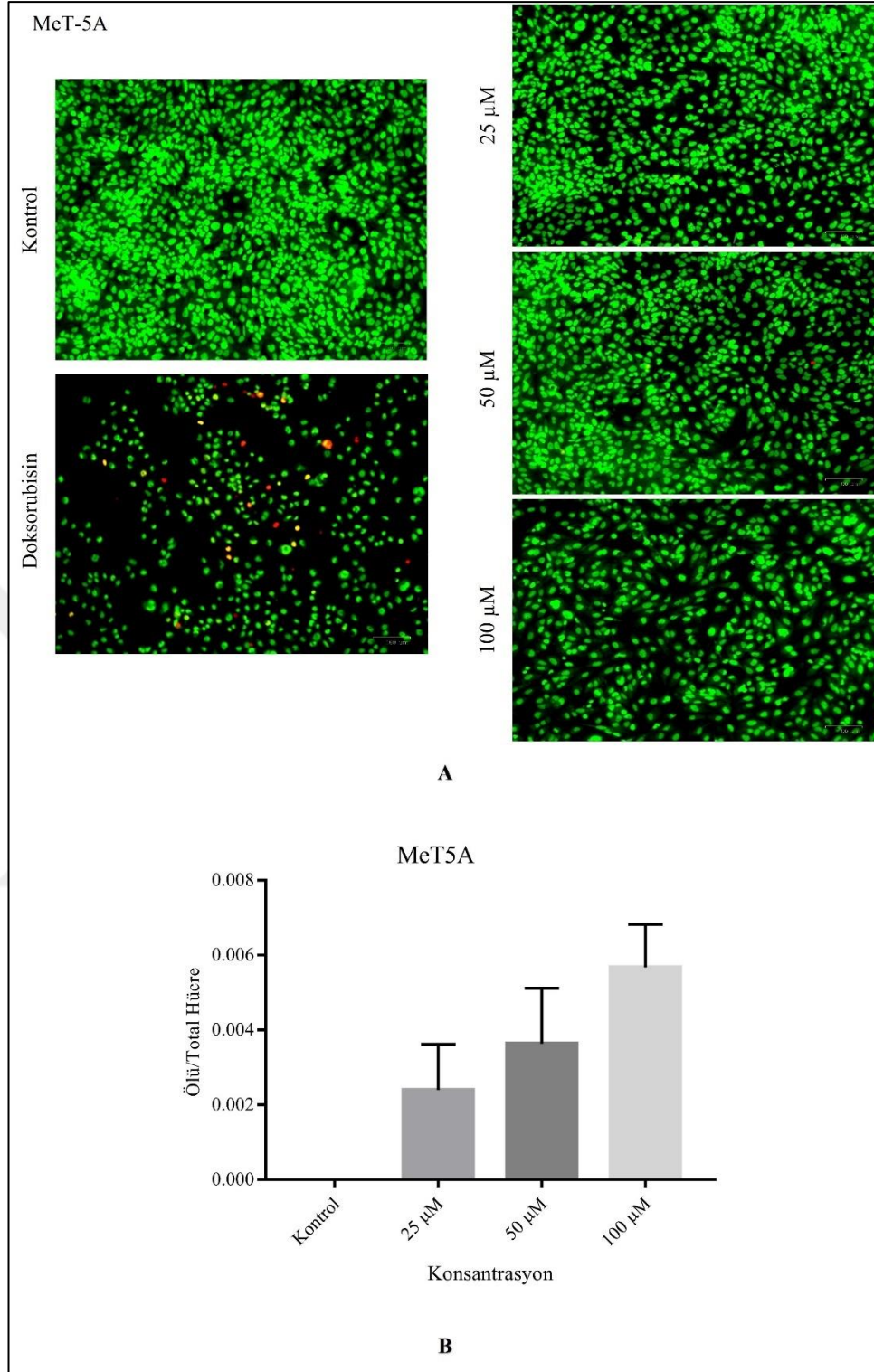
Şekil 4.6: CA'nın SPC212 hücre döngüsü üzerine etkisi. Hücre döngüsü profilinin konsantrasyona bağlı değişimi, PI boyama ve akış sitometrisi ile incelenmiştir (A). SPC212 hücrelerinde, hücre döngüsü aşamalarının yüzde olarak gösterimi (n=3, *p<0,05), (B).

4.4. CA'nın Hücre Ölümüne Etkisi

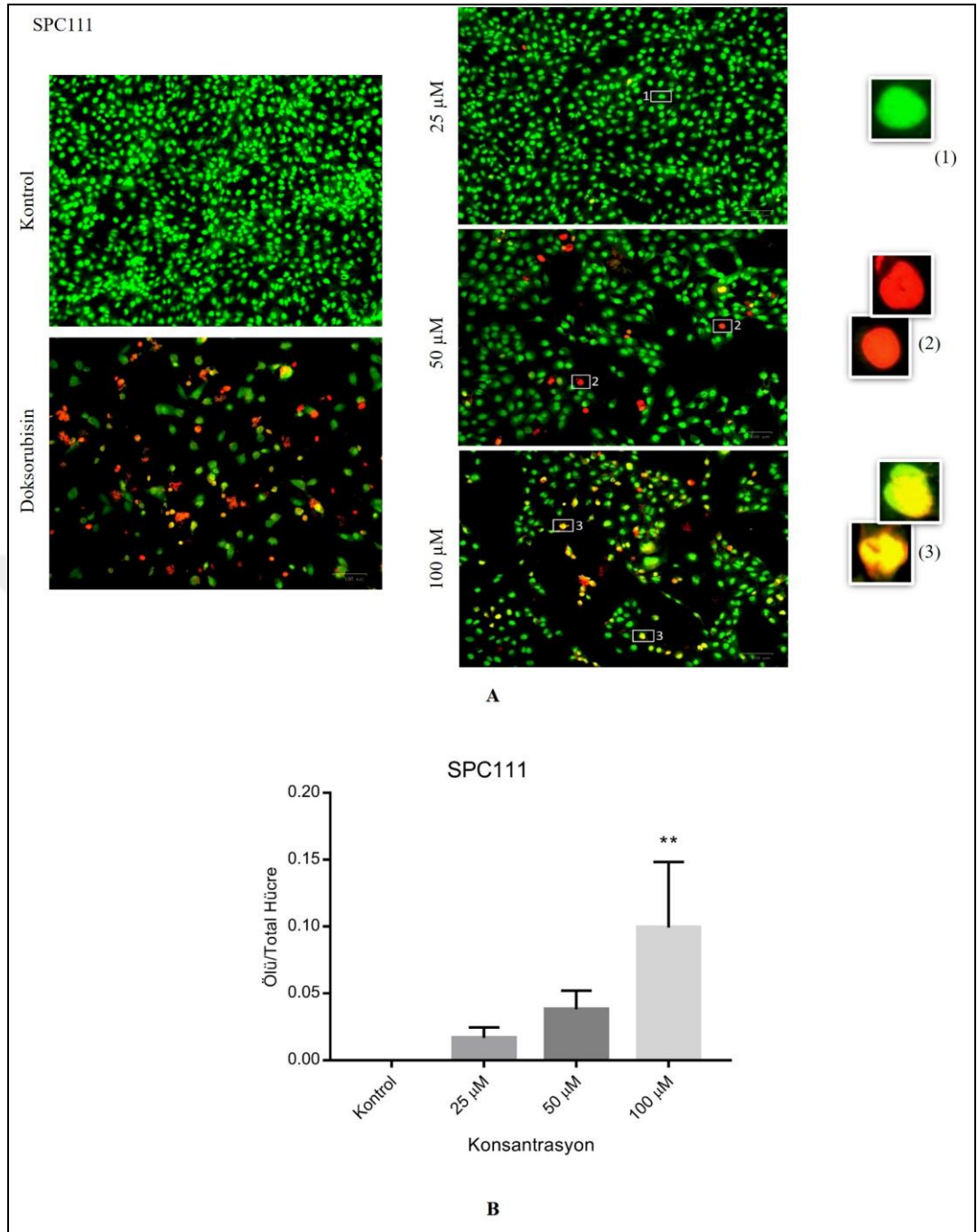
Hücre döngüsü analizlerinin takibinde, CA'nın hücre ölümüne etkisinin belirlenmesi amacıyla 0-100 μM konsantrasyonlarında CA uygulanan hücreler, 24 saatlik inkübasyon sonrasında AO/EtBr ve DAPI/PI boyamalarıyla morfolojik olarak incelenmiştir. AO/EtBr boyamasıyla canlı ve ölü hücre oranları ImageJ programı kullanılarak sayısal olarak hesaplanmıştır. DAPI/PI boyaması ise sadece kalitatif analizler yapılmıştır.

AO/EtBr boyamasında, canlı ve ölü hücreler AO ile boyanırken EtBr sadece membran bütünlüğü bozulmuş olan hücreleri boyamaktadır. Bu ikili boyama yöntemi ile ölü ve canlı hücrelerin zar bütünlüğü özelliğine dayanarak apoptotik olmayan, apoptotik ve nekrotik hücreler ayırt edilebilmektedir [Kasibhatla et al., 2006]. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9'un A bölümlerinde görüldüğü üzere, canlı ve apoptotik olmayan hücrelerin (1) çekirdekleri yeşil boyanırken; erken apoptotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması ve parçalanmış çekirdek yapısı gözlemlenmektedir, bu nedenle çekirdeklerde parlak yeşil noktalar görünmektedir. Geç apoptotik hücrelerde zar bütünlüğü bozulmuş durumdadır, bu nedenle EtBr bütünlüğü bozulan kısımlardan hücre içerisine sızabilmektedir ve bu hücrelerde parçalanmış çekirdek ve yoğunlaşmış kromatin yapıları da gözlemlenmektedir, bu nedenle çekirdekte turuncu noktalar veya tamamen turuncu görünürken (3); nekrotik hücreler de turuncuya boyanmakla birlikte yoğunlaşmış kromatin içermeyen ve canlı hücrelere benzeyen bir çekirdek morfolojisine sahip olmaktadır (2).

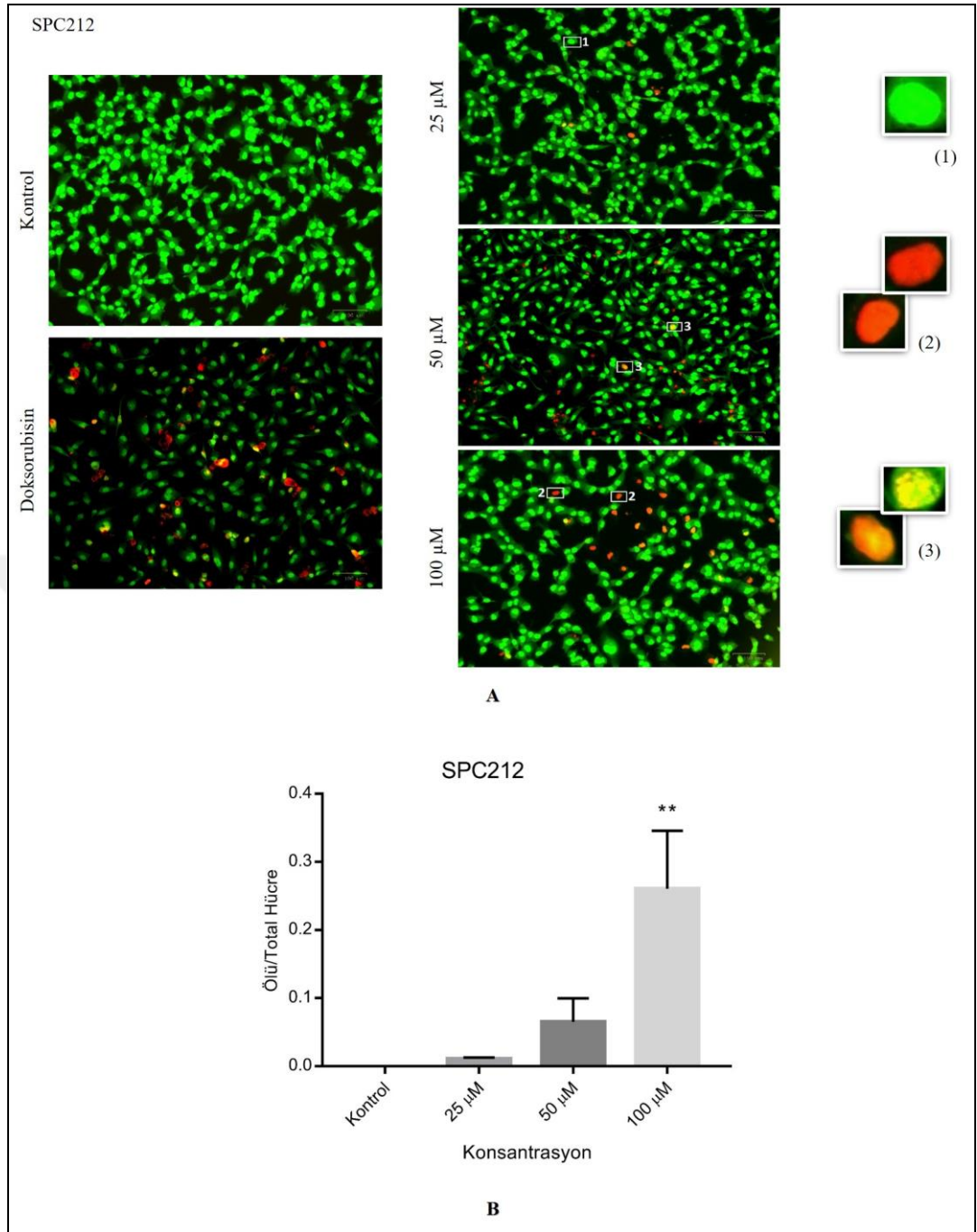
Uygulama yapılan iki kanser hücresinde canlı hücre sayısı azalırken ölü hücre sayısının arttığı belirlenmiştir. Apoptotik hücre morfolojisi 50 μM üzerinde görülmeye başlasa da 100 μM üzerindeki konsantrasyonlarda daha belirgindir. Buna karşın kontrol hücrelerinde (MeT-5A) ise apoptotik hücre oranı 100 μM konsantrasyona kadar gözlemlenmemiştir. Şekil. 4.7, 4.8 ve 4.9'un B bölümlerinde gösterilen bar grafiklerinde ölü/toplam hücre oranı, SPC111 ve SPC212 hücreleri için 100 μM konsantrasyonunda belirgin ölçüde artarken MeT-5A hücrelerinde, uygulanan konsantrasyon aralığında bir değişim belirlenmemiş, sadece hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Alınan apoptotik sonuçlar, canlılık analizi sonuçlarını desteklemekte ve CA'nın kanser hücrelerine seçici etkinliğine işaret etmektedir.



Şekil. 4.7: Met-5A hücrelerinde hücre ölümünün ve morfolojisinin gösterimi. 24 saatlik CA uygulaması (25, 50, 100 μ M) sonucu AO/EtBr boyaması ile hücre ölümü belirlenmiştir (20X büyütme, ölçek çubuğu 100 μ m), (A). Farklı konsantrasyonlarda CA uygulaması sonucu ölü/toplam hücre sayısı oranı hesaplanarak gösterilmiştir (n=3), (B).



Şekil. 4.8: SPC111 hücrelerinde hücre ölümünün ve morfolojisinin gösterimi. 24 saatlik CA uygulaması (25, 50, 100 μ M) sonucu AO/EtBr boyaması ile hücre ölümü belirlenmiştir (20X büyütme, ölçek çubuğu 100 μ m); canlı hücre morfolojisi (1), nekrotik morfolojisi (2) ve erken veya geç apoptotik hücre morfolojisi (3) ile gösterilmiştir (A). Farklı konsantrasyonlarda CA uygulaması sonucu ölü/toplam hücre sayısı oranı hesaplanarak gösterilmiştir (n=3, **p<0,01), (B).

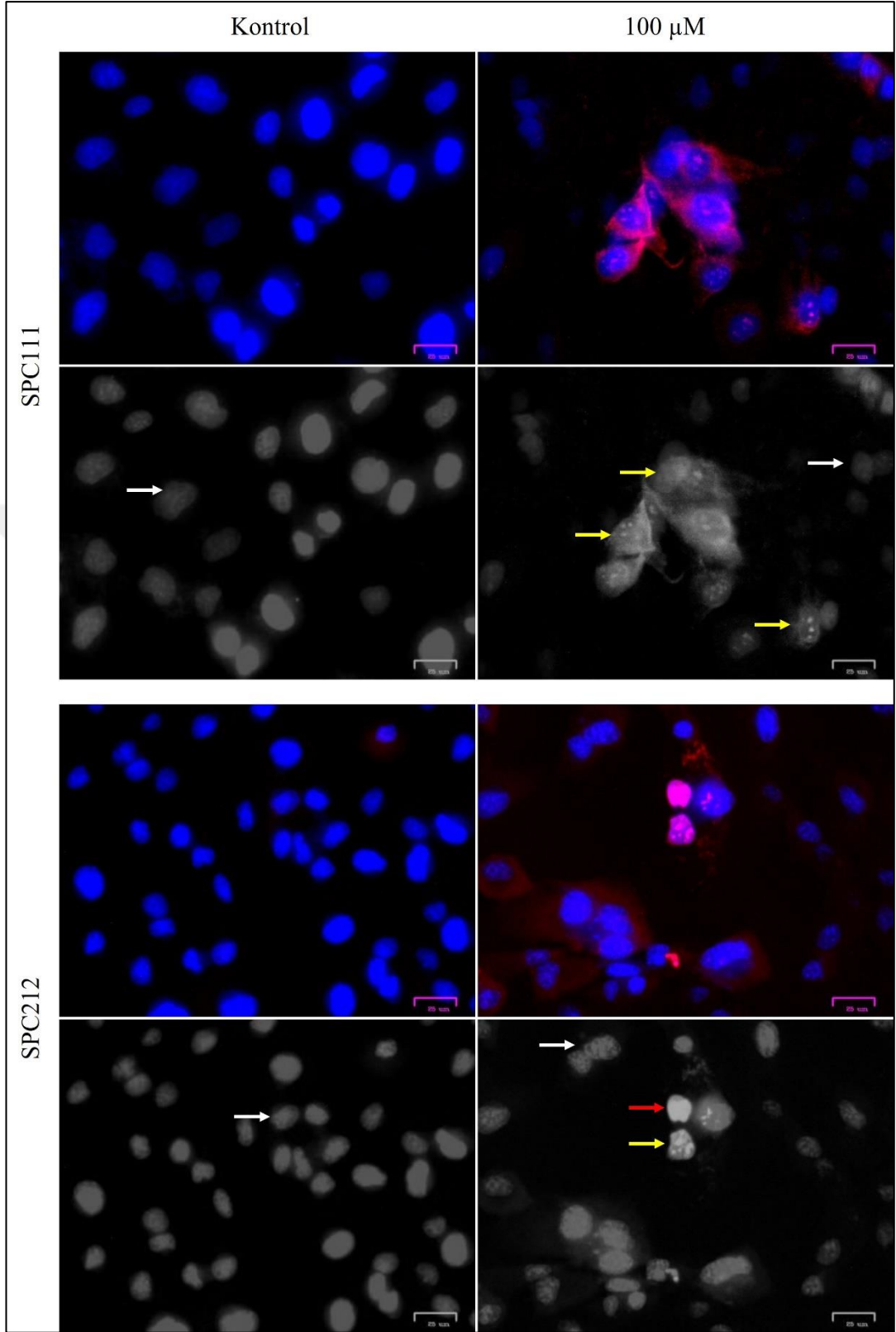


Şekil. 4.9: SPC212 hücrelerinde hücre ölümünün ve morfolojisinin gösterimi. 24 saatlik CA uygulaması (25, 50, 100 μ M) sonucu AO/EtBr boyaması ile hücre ölümü belirlenmiştir (20X büyütme, ölçek çubuğu 100 μ m); canlı hücre morfolojisi (1), nekrotik morfolojisi (2) ve erken veya geç apoptotik hücre morfolojisi (3) ile gösterilmiştir (A). Farklı konsantrasyonlarda CA uygulaması sonucu ölü/toplam hücre sayısı oranı hesaplanarak gösterilmiştir (n=3, **p<0,01), (B).

AO/EtBr ölçümlerine ilaveten analizler farklı set deneylerle bir kez daha, benzer metodolojiyle çalışan DAPI/PI boyaması ile tekrarlanmıştır. Canlı ve ölü hücreler DAPI ile boyanırken PI sadece membran bütünlüğü bozulmuş olan hücreleri

boyamaktadır. Hücre ölümünün tipi ne olursa olsun, zar bütünlüğünün kaybının aynı hücredeki çekirdek morfolojisi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Buna göre morfolojik analizler Cummings ve arkadaşlarının çalışmasına göre yapılmıştır [Cummings et al., 2012]. Şekil 4.10'da gösterildiği üzere, PI boyaması olmadan normal çekirdek morfolojisi gösteren hücreler canlı hücreler; PI boyaması olmadan çekirdek parçalanması, kromatin yoğunlaşması veya çekirdek yoğunlaşması gösteren hücreler apoptotik hücreler; PI varlığında çekirdek parçalanması veya kromatin yoğunlaşması gözlemlenen hücreler tipik olarak geç apoptoz geçirmekte olan hücrelerdir. PI için pozitif olan ve normal çekirdek morfolojisi veya çekirdek yoğunlaşması gösteren hücreler ise nekrotik hücreleri tanımlamaktadır.

DAPI/PI boyamasıyla elde edilen morfolojik görüntülerde, 100 μ M CA uygulaması sonucu apoptotik ve nekrotik hücreler belirgin olarak gözlemlenmektedir. Her iki boyama sonucu da CA'nın konsantrasyon bağımlı olarak SPC111 ve SPC212 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini işaret etmektedir.

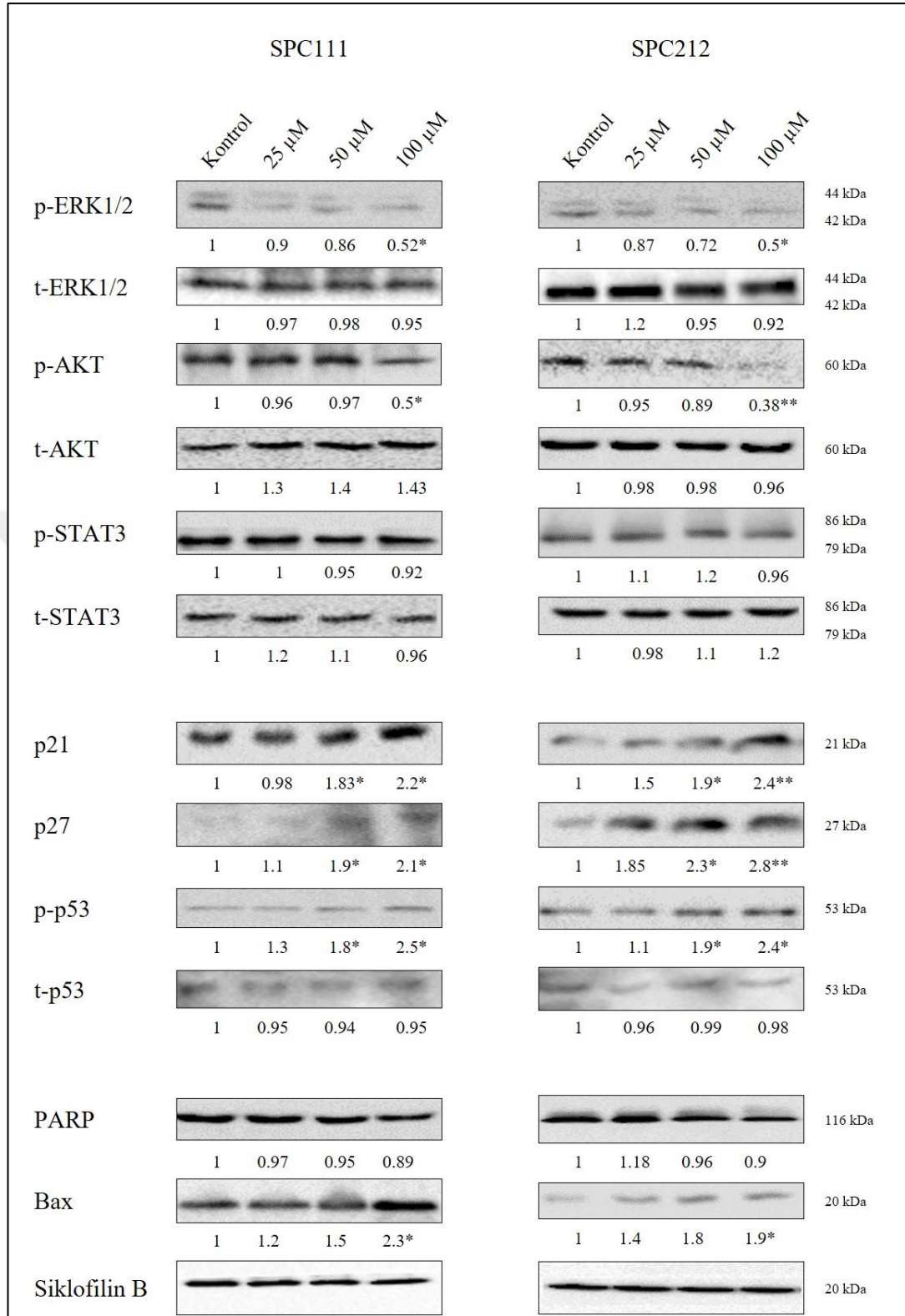


Şekil. 4.10: SPC111 ve SPC212 hücrelerinde 100 μ M CA uygulaması sonucu hücre ölümünün ve morfolojisinin DAPI/PI boyaması ile gösterimi. Normal (hasarsız) çekirdekler beyaz, kromatin yoğunlaşması sarı, nükleer yoğunlaşma ise kırmızı ok ile gösterilmektedir (20X büyütme; ölçek çubuğu, 25 μ m).

4.5. CA'nın Proliferasyon, Hücre Döngüsü ve Hücre Ölümünde Yer Alan Anahtar Proteinlere Etkisi

MM hücrelerinde CA uygulamasının (0-100 μ M) hücre proliferasyonu, döngüsü ve ölümünde rol alan anahtar protein seviyelerine etkisinin belirlenmesi amacıyla ilgili anahtar proteinlerin fosforilasyon, ifade ve kesim analizleri yapılmıştır (Şekil 4.11).

Her iki MM hücre hattında, hücre proliferasyonunu düzenleyen ERK1/2 ve AKT'nin fosforilasyon seviyelerinde konsantrasyon bağımlı düşüş gözlenirken, anlamlı azalmanın 100 μ M konsantrasyondan itibaren olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$). Her iki proteinin total ifade seviyelerinde ise önemli bir değişiklik belirlenmemiştir. Hücre proliferasyonunda etkin bir yolak olan STAT yolağında rol alan STAT3 proteininin, CA uygulamaları sonrası, proteinin fosforilasyon ve ifade seviyelerinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. Hücre döngüsü tutuklamasında rol alan p21 ve p27 proteinlerinin ifadelerinde her iki hücre hattında, 50 μ M konsantrasyondan itibaren anlamlı artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$). p53 fosforilasyon seviyelerinde de benzer artış gözlenirken ($p<0,05$), total p53 seviyelerinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. Bunlara ilaveten, apoptozun başladığını gösteren Bax seviyesinde konsantrasyon bağımlı artış belirlenmiştir. Her iki hücrede 100 μ M konsantrasyonda, apoptozda kaspaz 3 tarafından kesilen PARP seviyesinde azalma belirlense de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Deneylerin tekrar edilmesi düşünülmektedir.



Şekil. 4.11: CA'nın hücre protein seviyelerine etkisi. SPC111 ve SPC212 hücre hatlarında CA'nın anahtar proteinlere 0-100 µM konsantrasyon aralığında uygulanması ile hücre protein seviyelerindeki değişim (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

5. TARTIŞMA

Tanısı ve tedavisi oldukça zor olan MM, artan sayıda araştırmalara rağmen henüz etkin bir tedavisi bulunmayan bir kanserdir. Kanser tedavilerinde son yıllarda fenolik asitler gibi doğal bileşenler sıklıkla tercih edilmektedirler. Bu doğal bileşenlerden CINN ve CA çeşitli kanser araştırmalarında kullanılmıştır. CINN'in melanoma [Niero and Machado-Santelli, 2013], kolon kanseri [Soltanian et al., 2018] ve CA'nın meme kanseri [Rezaei-Seresht et al., 2019], melanoma [Pelinson et al., 2019], kolon kanseri [Murad et al., 2015], fibrosarkoma [Rajendra Prasad et al., 2011] ve hepatokarsinoma [Espíndola et al., 2019] hücreleri üzerinde araştırmaları bulunmaktadır.

Bu kapsamda çalışmamızda, CINN ve CA'nın anti-kanser etkilerinin araştırılması için MM hücreleri olan SPC111 ve SPC212 ve kontrol olarak MeT-5A hücreleri kullanılmıştır. Literatürden farklı olarak CINN ve CA'nın etkileri SPC111, SPC212 ve MeT-5A üzerinde ilk kez incelenmektedir. Yapılan canlılık analizlerinde, CINN ve CA uygulamasıyla her iki kanser hücresi sayısında konsantrasyona bağlı belirgin bir azalma gözlenirken, kontrol hücrelerinde ise sadece yüksek konsantrasyonlar uygulandığında belirgin azalma gözlemlenmiştir. Diğer bir deyişle CINN ve CA, SPC111 ve SPC212 hücrelerine karşı Met-5A'ya oranla daha çok toksik etki göstermiştir. Her iki molekül karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonlarda etkili olan ve kontrol hücrelerini kanser hücrelerine göre daha az etkileyen CA maddesi ile araştırmamıza devam edilmiştir.

Bilindiği üzere, MAPK ve PI3K/AKT, STAT3 yolları, hücrelerde çeşitli reaksiyonları modüle etmek için kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından gönderilen sinyalleri aşağı akış transkripsiyon faktörlerine iletmektedir [Tsai et al., 2013]. Potansiyel kanser ilaçlarının çoğu bu sinyal yollarını hedeflemektedir. CA uygulaması sonrası MAPK ve PI3K sinyal yollarında anahtar proteinler olan ERK1/2 ve AKT'nin fosforilasyonunun baskılanması CA'nın hücrenin hayatta kalımını ve proliferasyonunda bu yollar üzerinden etkili olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, STAT3 fosforilasyonunu (en azından kullanılan konsantrasyonlarda) etkilemediğinden, CA'nın etkinlik mekanizmasının STAT yolağı bağımsız olduğunu düşündürebilir. Benzer bir çalışmada, Rosendahl ve arkadaşları MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde, CA'nın anti-östrojenlerin

aktivitelerini taklit ettiğini ve ana büyüme düzenleyici sinyali östrojen reseptörü/siklin D1'i ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1/p-AKT'yi değiştirerek, hasarlı hücre döngüsü gelişimine ve hücresel proliferasyonun azalmasına neden olduğunu göstermiştir [Rosendahl et al., 2015]. Kolon kanseri (HCT116) hücrelerinin model olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada, kolorektal kanser kök hücrelerine CA ve AKT aktivatörünün birlikte uygulanmasıyla, CA'nın kolorektal kanser kök hücre küresi oluşumu üzerindeki önleyici etkileri ve CD44⁺ ve CD133⁺ hücrelerinden oluşan toplam hücre popülasyonunun yüzdesinin ve AKT sinyal aktivasyonu ile başarılı bir şekilde hafifletildiğini belirtilmiştir. CA ve AKT inhibitörünün birlikte uygulandığı kolorektal kanser kök hücre küresi oluşumu üzerinde inhibitör etkilerin gözlemlenmesiyle CA'nın bu hücrelerde hücre yenilenmesinin kök hücre benzeri özellikleri üzerindeki inhibe edici etkisinin, PI3K/AKT sinyal seviyelerini bozarak elde edilebileceğini göstermiştir [Park et al., 2020]. Bununla birlikte, Yang ve arkadaşları CA'nın, birincil fare epidermal keratinositlerinde ve HaCaT hücrelerinde güneş kaynaklı ultraviyole ışınması ile uyarılmış ERK fosforilasyonunu ve aşağı akış sinyalini baskıladığını, aynı zamanda fare cilt dokusunun protein analizleriyle ERK'lerin birkaç aşağı akış hedefinin güneş kaynaklı ultraviyole ışınması ile uyarılan fosforilasyonunun RSK2, Elk1 ve c-Myc dahil olmak üzere kafeik asit tarafından baskılandığını göstermiştir [Yang et al., 2014].

Hücre göçü deneylerinden elde edilen sonuçlar ile CA maddesinin SPC111 ve SPC212 hücrelerinde, konsantrasyon bağımlı olarak hücre göçünü ve bu doğrultuda kanser hücrelerinin metastaz yeteneğini kısıtlayabileceğini düşündürmektedir. CA uygulaması ile hücre göçünün belirgin şekilde azaldığı MDA-MB-231 [Kabała-Dzik et al., 2017] ve MCF-7 [Kabała-Dzik et al., 2018] meme kanseri hücrelerinde de gösterilmiştir. CA'nın, hücre invazyonunda da rol oynayan matris metalloproteinaz 9'u (MMP-9), nükleer faktör kappa B'yi (NF-κB) bloke ederek hücre göçünü kısıtladığı belirtilmektedir [Alam et al., 2022]. İlaveten, CA uygulanan malign HaCaT hücrelerinde p38, NF-κB'nin snail promotoruna DNA bağlama aktivitesini azaltarak snail'in transkripsiyonel aşağı regülasyonuna sebep olduğu belirtilmiştir. Böylece, malign insan keratinositinde, p38/NF-κB/snail yolu üzerinden hücresel göç kapasitesinin CA ile inhibe edilebileceği bildirilmiştir [Yang et al., 2013]. Mezotelyoma hücreleri üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ERK 1/2 sinyalinin azalması ile hücresel invazyonun ve migrasyonun da azaldığı gösterilmiştir

[Tamminen et al., 2015]. Yukarıda da bahsedildiği gibi ERK1/2 seviyesi CA uygulamasıyla baskılanmaktadır. Bu kapsamda, ERK1/2'nin baskılanması bizim hücrelerimiz için de hem proliferasyonu hem de hücre göçünü engelleyen mekanizma dahilinde çalışabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Farklı çalışmalarla bu durum daha açık hale getirilebilir. İlaveten, MM hücrelerinde CA uygulamasını takiben E-Kaderin, metalloproteinazlar vb. proteinlerin [Fares et al., 2020] analizinin yapılması uygun olacaktır.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde (H1299) CA'nın sub-G1 fazındaki hücre popülasyonunu arttırdığını ve G1 ve G2/M fazlarındaki hücre popülasyonunu azaltarak, bu fazda hücre döngüsünü tutukladığı gösterilmiştir [Min et al., 2018]. Çalışmamızda, CA'nın MM hücrelerini G2/M fazında tutukladığı belirlenmiş, hücre döngüsünün tutuklanmasında rol alan p21 ve p27 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin de konsantrasyona bağlı bir şekilde arttığının belirlenmesiyle desteklenmiştir. Aktive p53'ün, DNA hasarının meydana gelmesi ile hücre döngüsü ilerlemesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmekte ve G2/M fazı hücre döngüsü tutuklamasında p53 mekanizması, CDK inhibitörü p21'in trans aktivasyonu ile gerçekleştiği bilinmektedir [Song et al., 2019]. Diğer bir deyişle etkin CA konsantrasyonlarında p53 seviyesindeki artış, CA'nın MM hücrelerini p21 ve p27 kullanımıyla hücre döngüsü tutuklamasına götürmektedir.

CA uygulaması sonrası elde edilen morfoloji analizleri, CA'nın kanser hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. İlaveten, protein analizlerinde PARP seviyesinin düşüşü ve Bax seviyesindeki artış ile kanser hücrelerini 100 μ M'dan itibaren apoptoza gönderdiğini desteklemektedir. CA'nın apoptotik etkisini inceleyen diğer bir çalışmada, K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde CA'nın hücre proliferasyonunu azaltması ile apoptozun içsel yolunu aktive etmesine benzer doğrultuda sonuç elde edilmiştir [Feriotta et al., 2021]. Diğer bir çalışmada Pelinson ve arkadaşları SK-Mel-28 melanoma hücrelerine 200 μ M CA uygulayarak, kaspaz 1, 3 ve 8'in gen ekspresyonunun CA uygulanmayan hücrelere kıyasla arttığını göstermiştir, bu da kafeik asit kaynaklı hücre ölümünün kaspaz bağımlı olabileceğini göstermektedir [Pelinson et al., 2019]. Tüm bunlara ilaveten, Teng ve arkadaşlarının HeLaS3 insan servikal epiteloid kanseri, KB/VIN çoklu ilaç direnci bulunan insan servikal kanseri ve ABCB1/Flp-InTM-293 insan P-glikoprotein (P-gp) stabil ekspresyon hücrelerinde

yaptıkları çalışmada, CA'nın insan P-gp'sinin dışa akış işlevini engelleyerek çoklu ilaç direnci sorununu hafifletebileceğini, CA'nın çeşitli modüle edici mekanizmalar aracılığıyla çoklu ilaç direnci bulunan kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçları hücre içerisinde tutmasına yardımcı olarak daha fazla apoptozu ve hücre ölümünü teşvik ettiği bulgularına ulaşmıştır [Teng et al., 2020]. Böylece, CA'nın kendi başına olmasa bile farklı tedavi yöntemlerine ek olarak uygulanmasının potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu çalışma temel alınarak MM hücrelerinde de benzer adımlar gelecekte takip edilebilir.

MM tedavisi ve çeşitli kanserin tedavisi için yeni potansiyel ilaçlar denenmektedir. Polifenoller gibi doğal kaynaklı maddeler antikanser ilaçlarının keşfi için potansiyel bileşenlerdir. Günümüzde birçok laboratuvar bu maddelerin insan üzerindeki antikanser etkileri üzerinde çalışmaktadır. Biz çalışmamızda CA'nın MM tedavisinde kullanılabilirliği açısından hücresel proliferasyon, migrasyon, hücre döngüsü ve ölümü ve hücre protein seviyelerine etkisini değerlendirdik. CA'nın MM hücreleri üzerindeki anti-kanser potansiyeline dair ön bulgular elde ettik ve ileri analizler ile etki mekanizmasının daha derin bir şekilde araştırılmasını hedeflemekteyiz.

KAYNAKLAR

Abdel-Rahman O., (2017), "Role of postoperative radiotherapy in the management of malignant pleural mesothelioma", *Strahlentherapie und Onkologie*, 193(4), 276-284.

Adisakwattana S., (2017), "Cinnamic acid and its derivatives: Mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications", *Nutrients*, 9(2), 163.

Aggarwal C., Albelda S. M., (2018), "Molecular characterization of malignant mesothelioma: time for new targets?", *Cancer discovery*, 8(12), 1508-1510.

Alam M., Ahmed S., Elsbali A. M., Adnan M., Alam S., Hassan M. I., Pasupuleti V. R. (2022), "Therapeutic implications of caffeic acid in cancer and neurological diseases", *Frontiers in Oncology*, 12.

Anantharaju P. G., Gowda P. C., Vimalambike M. G., Madhunapantula S. V., (2016), "An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers", *Nutrition journal*, 15(1), 99.

Barbosa R., Acevedo L. A., Marmorstein R., (2021), "The MEK/ERK network as a therapeutic target in human cancer", *Molecular Cancer Research*, 19(3), 361-374.

Baykara O., (2016), "Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar", *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.

Berzenji L., Van Schil P., (2018), "Multimodality treatment of malignant pleural mesothelioma", *F1000Research*, 7.

Bibby A. C., Tsim S., Kanellakis N., Ball H., Talbot D. C., Blyth K. G., ... Psallidas I., (2016), "Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment", *European Respiratory Review*, 25(142), 472-486.

Boussios S., Moschetta M., Karathanasi A., Tsiouris A. K., Kanellos F. S., Tatsi K., ... Christodoulou D. K., (2018), "Malignant peritoneal mesothelioma: clinical aspects, and therapeutic perspectives", *Annals of gastroenterology*, 31(6), 659.

Brown J. S., O'Carrigan B., Jackson S. P., Yap T. A., (2017), "Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors", *Cancer discovery*, 7(1), 20-37.

Burotto M., Chiou V. L., Lee J. M., Kohn E. C., (2014), "The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective", *Cancer*, 120(22), 3446-3456.

Butchart E. G., Ashcroft T., Barnsley W. C., Holden M. P., (1976), "Pleuropneumonectomy in the management of diffuse malignant mesothelioma of the pleura. Experience with 29 patients", *Thorax*, 31(1), 15-24.

Cakiroglu E., Senturk, S., (2020), "Genomics and functional genomics of malignant pleural mesothelioma", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6342.

Carbone M., Yang H., (2012), "Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma", *Clinical Cancer Research*, 18(3), 598-604.

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

Chen H., Zhou L., Wu X., Li R., Wen J., Sha J., Wen X., (2016), "The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer", *Front Biosci (Landmark Ed)*, 21, 1084-1091.

Cooper J., Giancotti F. G., (2014), "Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function", *FEBS letters*, 588(16), 2743-2752.

Costa R. L., Han H. S., Gradishar W. J., (2018), "Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review", *Breast cancer research and treatment*, 169(3), 397-406.

Coşan D. T., Ak G., Dağ İ., Soyocak A., Dikmen G., Dal A., ... Metintaş M., (2016), "Malign plevral mezotelyomada ilaç taşıyıcı nanosistemler", *Tuberk Toraks*, 64(1), 60-68.

Cummings B. S., Wills L. P., Schnellmann R. G., (2012), "Measurement of cell death in Mammalian cells", *Current protocols in pharmacology*, 56(1), 12-8.

D'Arcy M. S., (2019), "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy", *Cell biology international*, 43(6), 582-592.

de Assis L. V. M., Isoldi M. C., (2014), "The function, mechanisms, and role of the genes PTEN and TP53 and the effects of asbestos in the development of malignant mesothelioma: a review focused on the genes' molecular mechanisms", *Tumor Biology*, 35(2), 889-901.

de Gooijer C. J., Baas P., Burgers J. A., (2018), "Current chemotherapy strategies in malignant pleural mesothelioma", *Translational lung cancer research*, 7(5), 574.

Dhillon A. S., Hagan S., Rath O., Kolch W., (2007), "MAP kinase signalling pathways in cancer", *Oncogene*, 26(22), 3279-3290.

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

Espíndola K. M. M., Ferreira R. G., Narvaez L. E. M., Rosario A. C. R. S., da Silva A. H. M., Silva A. G. B., Monteiro M. C., (2019), "Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma", *Frontiers in oncology*, 9.

Fares J., Fares M. Y., Khachfe H. H., Salhab H. A., Fares Y. (2020), "Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited", *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-17.

Feriotto G., Tagliati F., Giriolo R., Casciano F., Tabolacci C., Beninati S., ... Mischiati C. (2021), "Caffeic acid enhances the anti-leukemic effect of imatinib on chronic myeloid leukemia cells and triggers apoptosis in cells sensitive and resistant to imatinib", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1644.

Galani V., Varouktsi A., Papadatos S. S., Mitselou A., Sainis I., Constantopoulos S., Dalavanga Y., (2019), "The role of apoptosis defects in malignant mesothelioma pathogenesis with an impact on prognosis and treatment", *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1-13.

Gandhi M., Nair S., (2020), "New vistas in malignant mesothelioma: MicroRNA architecture and NRF2/MAPK signal transduction", *Life Sciences*, 257, 118123.

Grada A., Otero-Vinas M., Prieto-Castrillo F., Obagi Z., Falanga V., (2017), "Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay", *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11-e16.

Groner B., von Manstein V., (2017), "Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition", *Molecular and cellular endocrinology*, 451, 1-14.

Gu Y., Mohammad I. S., Liu Z., (2020), "Overview of the STAT-3 signaling pathway in cancer and the development of specific inhibitors", *Oncology Letters*, 19(4), 2585-2594.

Guo G., Chmielecki J., Goparaju C., Heguy A., Dolgalev I., Carbone M., ... Pass H. I., (2015), "Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma", *Cancer research*, 75(2), 264-269.

Hajj G. N., Cavarson C. H., Pinto C. A. L., Venturi G., Navarro J. R., Lima V. C., (2021), "Malignant pleural mesothelioma: an update", *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 47.

Hausman D. M., (2019), "What Is Cancer?", *Perspectives in biology and medicine*, 62(4), 778-784.

Hazafa A., Rehman K. U., Jahan N., Jabeen Z., (2020), "The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells", *Nutrition and cancer*, 72(3), 386-397.

Henley S. J., Ward E. M., Scott S., Ma J., Anderson R. N., Firth A. U., ... Kohler B. A., (2020), "Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics", *Cancer*, 126(10), 2225-2249.

Hmeljak J., Sanchez-Vega F., Hoadley K. A., Shih J., Stewart C., Heiman D., ... Ladanyi M., (2018), "Integrative molecular characterization of malignant pleural mesothelioma", *Cancer discovery*, 8(12), 1548-1565.

Hofmarcher T., Lindgren P., Wilking N., Jönsson B., (2020), "The cost of cancer in Europe 2018", *European Journal of Cancer*, 129, 41-49.

Jha A. K., Nikbakht M., Jain V., Capalash N., Kaur J., (2012), "p16INK4a and p15INK4b gene promoter methylation in cervical cancer patients", *Oncology letters*, 3(6), 1331-1335.

Kabała-Dzik A., Rzepecka-Stojko A., Kubina R., Jastrzębska-Stojko Ż., Stojko R., Wojtyczka R. D., Stojko J. (2017), "Migration rate inhibition of breast cancer cells treated by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester: An in vitro comparison study", *Nutrients*, 9(10), 1144.

Kabała-Dzik A., Rzepecka-Stojko A., Kubina R., Wojtyczka R. D., Buszman E., Stojko J. (2018), "Caffeic acid versus caffeic acid phenethyl ester in the treatment of breast cancer MCF-7 cells: migration rate inhibition", *Integrative cancer therapies*, 17(4), 1247-1259.

Kaczanowski S., (2016), "Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging", *Physical biology*, 13(3), 031001.

Kapeles M., Gensheimer M. F., Mart D. A., Sottero T. L., Kusano A. S., Truong A., ... Patel S. A., (2018), "Trimodality Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma", *American Journal of Clinical Oncology*, 41(1), 30-35.

Kasibhatla S., Amarante-Mendes G. P., Finucane D., Brunner T., Bossy-Wetzel E., Green D. R., (2006), "Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis", *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(3), pdb-prot4493.

Kim E. K., Choi E. J., (2010), "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396-405.

Kiraz Y., Adan A., Kartal Yandim M., Baran Y., (2016), "Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis", *Tumor Biology*, 37(7), 8471-8486.

Kopustinskiene D. M., Jakstas V., Savickas A., Bernatoniene J., (2020), "Flavonoids as anticancer agents", *Nutrients*, 12(2), 457.

Lapidot M., Case A. E., Larios D., Gandler H. I., Meng C., Tošić I., ... Sattler M. (2020), "Inhibitors of the transcription factor STAT3 decrease growth and induce immune response genes in models of malignant pleural mesothelioma (MPM)", *Cancers*, 13(1), 7.

Li C., Rezov V., Joensuu E., Vartiainen V., Rönty M., Yin M., ... Koli K., (2018), "Pirfenidone decreases mesothelioma cell proliferation and migration via inhibition of ERK and AKT and regulates mesothelioma tumor microenvironment in vivo", *Scientific reports*, 8(1), 1-14.

Liao D., Yu Y., Mei Q., Wang Z., Li X., Jia Y., Kong F., (2021), “Advances in Immunotherapy of Malignant Pleural Mesothelioma”, *OncoTargets and therapy*, 14, 4477.

Lien E. C., Dibble C. C., Toker A., (2017), “PI3K signaling in cancer: beyond AKT”, *Current opinion in cell biology*, 45, 62-71.

Liu F., Yang X., Geng M., Huang M., (2018), “Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy”, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(4), 552-562.

Mabuchi S., Kuroda H., Takahashi R., Sasano T., (2015), “The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer”, *Gynecologic oncology*, 137(1), 173-179.

MacLeod N., Chalmers A., O'Rourke N., Moore K., Sheridan J., McMahon L., ... Laird B. J., (2015), “Is radiotherapy useful for treating pain in mesothelioma?: A phase II trial”, *Journal of Thoracic Oncology*, 10(6), 944-950.

Maik-Rachline G., Hacohen-Lev-Ran A., Seger R., (2019), “Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer”, *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1194.

Maleki S. J., Crespo J. F., Cabanillas B., (2019), “Anti-inflammatory effects of flavonoids”, *Food Chemistry*, 299, 125124.

Menis J., Pasello G., Remon, J., (2021), “Immunotherapy in malignant pleural mesothelioma: a review of literature data”, *Translational Lung Cancer Research*, 10(6), 2988.

Metintas S., Ak G., Metintas M., (2020), “Potential years of life and productivity loss due to malignant mesothelioma in Turkey”, *Archives of environmental & occupational health*, 75(8), 464-470.

Metintaş S., Batirel H. F., Bayram H., Yılmaz Ü., Karadağ M., Ak G., Metintaş M., (2017), “Turkey national mesothelioma surveillance and environmental asbestos exposure control program”, *International journal of environmental research and public health*, 14(11), 1293.

Min J., Shen H., Xi W., Wang Q., Yin L., Zhang Y., ... Wang Z. N. (2018), “Synergistic anticancer activity of combined use of caffeic acid with paclitaxel enhances apoptosis of non-small-cell lung cancer H1299 cells in vivo and in vitro”, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(4), 1433-1442.

Mummudi N., Khan A., Tibdewal A., Kumar R., Jiwnani S., Karimundackal G., ... Agarwal J. P., (2020), “Trimodality treatment in malignant pleural mesothelioma—Ordeal or real deal?”, *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 25(6), 876-881.

Murad L. D., Soares N. D. C. P., Brand C., Monteiro M. C., Teodoro A. J., (2015), "Effects of caffeic and 5-caffeoylquinic acids on cell viability and cellular uptake in human colon adenocarcinoma cells", *Nutrition and Cancer*, 67(3), 532-542.

Musial C., Kuban-Jankowska A., Gorska-Ponikowska M., (2020), "Beneficial properties of green tea catechins", *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1744.

Niero E. L. D. O., Machado-Santelli G. M., (2013), "Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells", *Journal of experimental & clinical cancer research*, 32(1), 1-14.

O'Donnell J. S., Massi D., Teng M. W., Mandala M., (2018, February), "PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux", *Seminars in cancer biology* (Vol. 48, pp. 91-103). Academic Press.

Opitz I., Furrer K., (2020), "Preoperative identification of benefit from surgery for malignant pleural mesothelioma", *Thoracic surgery clinics*, 30(4), 435-449.

O'Shea J. J., Schwartz D. M., Villarino A. V., Gadina M., McInnes I. B., Laurence A., (2015), "The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention", *Annual review of medicine*, 66, 311-328.

Park S. R., Kim S. R., Hong I. S., & Lee H. Y. (2020), "A novel therapeutic approach for colorectal cancer stem cells: blocking the PI3K/Akt signaling axis with caffeic acid", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 585987.

Pelinson L. P., Assmann C. E., Palma T. V., da Cruz I. B. M., Pillat M. M., Mânica A., ... Ulrich H., (2019), "Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells", *Molecular biology reports*, 46(2), 2085-2092.

Pencik J., Pham H. T. T., Schmoellerl J., Javaheri T., Schleiderer M., Culig Z., ... Kenner L., (2016), "JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome", *Cytokine*, 87, 26-36.

Petrilli A. M., Fernández-Valle C., (2016), "Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology", *Oncogene*, 35(5), 537-548.

Pfeffer C. M., Singh A. T., (2018), "Apoptosis: a target for anticancer therapy", *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.

Pistritto G., Trisciuglio D., Ceci C., Garufi A., D'Orazi G., (2016), "Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies", *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.

Rajendra Prasad N., Karthikeyan A., Karthikeyan S., Venkata Reddy B., (2011), "Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line", *Molecular and cellular biochemistry*, 349(1), 11-19.

Rezaei-Seresht H., Cheshomi H., Falanji F., Movahedi-Motlagh F., Hashemian M., Mireskandari E., (2019), "Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study", *Avicenna journal of phytomedicine*, 9(6), 574.

Rosendahl A. H., Perks C. M., Zeng L., Markkula A., Simonsson M., Rose C., ... Jernström H. (2015), "Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor and insulin-like growth factor I receptor levels in human breast cancer", *Clinical Cancer Research*, 21(8), 1877-1887.

Santarpia L., Lippman S. M., El-Naggar A. K., (2012), "Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy", *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(1), 103-119.

Sawai C. M., Freund J., Oh P., Ndiaye-Lobry D., Bretz J. C., Strikoudis A., ... Aifantis I., (2012), "Therapeutic targeting of the cyclin D3: CDK4/6 complex in T cell leukemia", *Cancer cell*, 22(4), 452-465.

Sayan M., Eren M. F., Gupta A., Ohri N., Kotek A., Babalioglu I., ... Atalar B., (2019), "Current treatment strategies in malignant pleural mesothelioma with a treatment algorithm", *Advances in respiratory medicine*, 87(5), 289-297.

Sayan M., Mamidanna S., Eren M. F., Daliparty V., Mustafayev T. Z., Nelson C., ... Atalar B., (2020), "New horizons from novel therapies in malignant pleural mesothelioma", *Advances in respiratory medicine*, 88(4), 343-351.

Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W., (2012), "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods*, 9(7), 671-675.

Schroeder R. D., Angelo L. S., Kurzrock R., (2014), "NF2/merlin in hereditary neurofibromatosis 2 versus cancer: biologic mechanisms and clinical associations", *Oncotarget*, 5(1), 67.

Sekido Y., (2008), "Molecular biology of malignant mesothelioma", *Environmental health and preventive medicine*, 13(2), 65-70.

Selvakumar P., Badgeley A., Murphy P., Anwar H., Sharma U., Lawrence K., Lakshmikuttyamma A., (2020), "Flavonoids and other polyphenols act as epigenetic modifiers in breast cancer", *Nutrients*, 12(3), 761.

Soltanian S., Riahirad H., Pabarja A., Jafari E., Khandani B. K., (2018), "Effect of Cinnamic acid and FOLFOX in diminishing side population and downregulating cancer stem cell markers in colon cancer cell line HT-29", *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(1), 19-29.

Song Z., Yin Y., Hao S., Wei J., Liu B., Huang X., ... Cai D. (2019), "JS-K induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in A549 and H460 cells via the p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathways", *Oncology Reports*, 41(6), 3475-3487.

Spugnini E. P., Bosari S., Citro G., Lorenzon I., Cognetti F., Baldi A., (2006), “Human malignant mesothelioma: molecular mechanisms of pathogenesis and progression”, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(12), 2000-2004.

Tamminen J. A., Yin M., Rönty M., Sutinen E., Pasternack A., Ritvos O., ... Koli K. (2015), “Overexpression of activin-A and-B in malignant mesothelioma–Attenuated Smad3 signaling responses and ERK activation promote cell migration and invasive growth”, *Experimental cell research*, 332(1), 102-115.

Teng Y. N., Wang C. C., Liao W. C., Lan Y. H., & Hung C. C. (2020), “Caffeic acid attenuates multi-drug resistance in cancer cells by inhibiting efflux function of human P-glycoprotein”, *Molecules*, 25(2), 247.

Tsai C. M., Yen G. C., Sun F. M., Yang S. F., Weng C. J. (2013), “Assessment of the anti-invasion potential and mechanism of select cinnamic acid derivatives on human lung adenocarcinoma cells”, *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), 1890-1900.

Vivo M., Matarese M., Sepe M., Di Martino R., Festa L., Calabro V., ... Pollice A., (2015), “MDM2-mediated degradation of p14ARF: a novel mechanism to control ARF levels in cancer cells”, *PloS one*, 10(2), e0117252.

Wang J. J., Lei K. F., Han F., (2018), “Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments”, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(12), 3855-3864.

Web 1, (2021), https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/yayinlar/raporlar/2021_Kanser_Kontrol_Programi_/17.Agustos_2021_Kanser_Kontrol_Programi_versiyon-1.pdf, (Erişim Tarihi: 05/12/21).

Web 2, (2021), <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga/studied-cancers/mesothelioma>, (Erişim Tarihi: 12/12/21).

Web 3, (2022), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444539#section=2D-Structure>, (Erişim Tarihi: 23/03/22).

Web 4, (2022), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid#section=2D-Structure>, (Erişim Tarihi: 23/03/22).

Wong R. S., (2011), “Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment”, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.

Xie Y., Shi X., Sheng K., Han G., Li W., Zhao Q., ... Gu Y., (2019), “PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia”, *Molecular medicine reports*, 19(2), 783-791.

Xio S., Li D., Vijg J., Sugarbaker D. J., Corson J. M., Fletcher J. A., (1995), “Codeletion of p15 and p16 in primary malignant mesothelioma”, *Oncogene*, 11(3), 511-515.

Yang G., Fu Y., Malakhova M., Kurinov I., Zhu F., Yao K., ... Dong Z. (2014), "Caffeic acid directly targets ERK1/2 to attenuate solar UV-induced skin carcinogenesis", *Cancer Prevention Research*, 7(10), 1056-1066.

Yang Y., Li Y., Wang K., Wang Y., Yin W., & Li L. (2013), "P38/NF- κ B/snail pathway is involved in caffeic acid-induced inhibition of cancer stem cells-like properties and migratory capacity in malignant human keratinocyte", *PloS one*, 8(3), e58915.

Zugazagoitia J., Guedes C., Ponce S., Ferrer I., Molina-Pinelo S., Paz-Ares L., (2016), "Current challenges in cancer treatment", *Clinical therapeutics*, 38(7), 1551-1566.



ÖZGEÇMİŞ

Dayk MURATOĞLU, lise eğitimini Ahmet Keleşoğlu Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde 2019 yılında tamamladı. Yüksek lisans eğitimini Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik anabilim dalında 2022 yılında tamamladı.

