



## Anticancer Effect of Gallic Acid Against HeLa Cervical Cancer Cell Line

### Abstract

**Aim:** Cervical cancer is the fourth most common cancer affecting women worldwide, which has a very important place in female infertility. Doxorubicin (Dox) is one of the most commonly prescribed chemotherapeutics in the treatment of ovarian and breast cancer. Although chemotherapeutic drugs respond with very effective treatment results, they cause serious side effects and the development of drug resistance limits the use of these drugs. The use of natural products with anticancer activity can help partially overcome these problems. Gallic acid (GA) is widely found in various plants and foods and has been reported to have various biological effects. In this study, the effects of GA and Dox, a potent chemotherapy agent, on cell growth inhibition and death on HeLa cells and human skin keratinocyte cell line (HaCaT) MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) method.

**Method:** Cervical adenocarcinoma cell line HeLa (CCL-2™) and human skin keratinocyte cell line HaCat (RRID:CVCL\_0038) as healthy cell line were used in the study. In order to determine the IC50 (inhibitory concentration) doses of Dox and GA, HeLa and HaCaT cell lines were cultivated with the help of an automatic multipipette. Then, MTT test was applied to perform cell survival (viability) analyses.

**Results:** HeLa cell growth was approximately 137.6 IC50 at 48th hour in Dox-treated cells, while the IC50 of GA at 48th hour was 239.2 µM.

**Conclusion:** These results show that GA potentiates the effect of Dox and the Dox/GA acid combination may be a promising alternative to other chemotherapeutic combinations in the treatment of cervical cancer with lower side effects.

**Keywords:** Gallic acid, HeLa, Cervical cancer, MTT.

## GİRİŞ

Kanser, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve 2018'de tahminen 9,6 milyon ölümden sorumludur<sup>1</sup>. Akciğer kanseri erkekler arasında en sık görülen kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir, bunu prostat ve kolorektal kanser (insidans açısından) ve karaciğer ve mide kanseri (ölüm oranı açısından) izlemektedir. Kadınlar arasında meme kanseri en sık teşhis edilen kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir, bunu kolorektal ve akciğer kanseri (insidans açısından) ve bunun tersi (mortalite açısından) izler. Serviks kanseri hem insidans hem de mortalite açısından dünya çapında kadınları etkileyen dördüncü kanser tipidir<sup>2,3</sup>. Kanser gelişimi hücrenin birçok özelliğini içerdiğinden, kanserin tek bir terapi ile tedavisi nadiren etkilidir<sup>4</sup>. Kombinasyon tedavisi, kanser kemoterapisinde öne çıkan bir yaklaşımdır. Farklı yollar hedefleneceğinden ve her bir ilacın daha düşük dozajı gerektiğinden, toksisite önemli ölçüde daha azdır<sup>5,6</sup>. Bununla birlikte, kimyasal olarak sentezlenmiş birçok antikanser ilacın kullanımı hastalarda önemli yan etkilere neden olmuştur. Bu nedenle, doğal

ürünlere dayalı yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesi birçok araştırmanın odak noktası olmuştur<sup>7,8</sup>. Bazı raporlar, doğal ürünlerin meme kanseri, baş ve boyun kanseri hücreleri gibi farklı kanser türlerinin tedavisinde farklı mekanizmalar yoluyla kanser çoğalmasını bastırmada kullanıldığını gösterdiğini göstermiştir<sup>9-11</sup>.

Gallik asit (GA), yeşil çay, üzüm, çilek, muz ve diğer birçok meyve gibi çeşitli doğal ürünlerde bulunabilen bir polihidroksifenolik bileşiktir<sup>12</sup>. Bir dizi çalışma Gallik asit ve türevlerinin hem in vivo hem de in vitro potansiyel antikanser aktivitesini göstermiştir<sup>13</sup>. Aslında, insan yumurtalık kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde Gallik asidin anti-kanser aktivitesi rapor edilmiştir<sup>14,15</sup>. Gallik asidin antikanser etkisinin, hücre proliferasyonunu inhibe etme ve apoptozu indüklemeye kabiliyetinden kaynaklandığı kanıtlanmıştır<sup>16</sup>.

Bu çalışmada, Gallik asidin Dox ile tekli ve kombinasyon tedavisi ile olası sinerjistik veya antagonistik etkisini araştırmayı amaçladık.

Sonuç olarak kemoterapi dışında servikal kanserde dahil olmak üzere diğer kanser vakalarında alternatif tedavi seçenekleri çok mevcut değildir. Bu çalışmada alternatif tedavi olarak kemoterapinin etkilerini azaltacak ajanların tespit edilmesi ve etkinliklerinin ortaya çıkarılması için mevcut literatürde çalışmaları devam eden ajanlardan Gallik asit araştırılmıştır.

## YÖNTEMLER

### Hücrelerin kültürü ve pasajı

Çalışmada serviks adenokarsinoma hücre serisi HeLa (CCL-2™) ve sağlıklı hücre serisi olarak insan deri keratinosit hücre serisi HaCat (RRID:CVCL 0038) kullanılmıştır. HeLa hücre serisi %10 FBS, 2 mM L-glutamine ve %1 penicillin/streptomycin içeren EMEM besi ortamında, HaCaT hücre hattı ise aynı katkıları içeren DMEM besi ortamında kültüre alınmış ve hücreler steril inkübatörlerde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO2 içeren inkübatörde yetiştirilmiştir. Çalışmaların tümünde hücre hatlarının 5. pasajlarından başlanmış ve 20. pasajda çalışma sonlandırılmıştır.

HeLa ve HaCaT hücre hatlarında Doxorubicin ve Gallik asit ajanlarının IC50 dozlarının belirlenmesi

Çalışmada Dox ve Gallik asit ajanlarının stok solusyonları ultrapure Etanol (Merck, ABD) kullanılarak hazırlanmış, Dox için 5 mM, GA için 100 mM stok solusyonlar yapılmış, bunlar porsiyonlanarak -20°C de depolanmıştır. Yapılan uygulamalarda 96 kuyucuklu kültür kabında taşıt maddenin son konsantrasyonu %0,1 seviyesine düşürülmüştür.

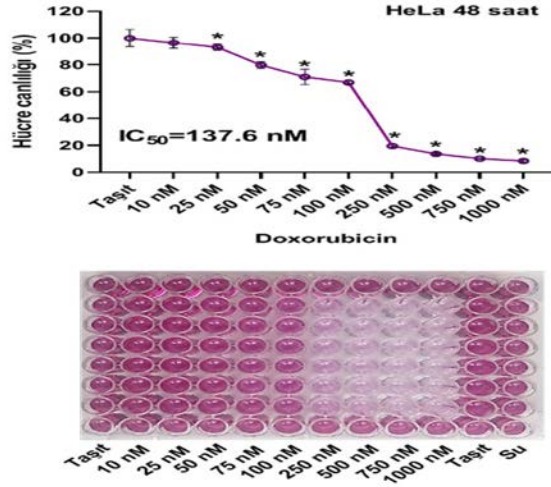
Doxorubicin ve GA IC50 dozlarının belirlenmesi için HeLa ve HaCaT hücre hattı, 96-kuyucuklu kültür kaplarında (plate) sırasıyla her bir kuyucukta 3000-5000 olacak şekilde otomatik multipipetleme ile ekim yapılmıştır. Bir gece (yaklaşık 16 saat süre) sonunda Dox 10-1000 nM ve Gallik asit 10-1000 µM doz aralıklarında seri sulandırım ile elde edilen 9 farklı

konsantrasyonda uygulanmış ve plateler 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. MTT hücre canlılığı analizinde, 96 kuyucuklu kültür kabının dış tarafındaki kuyucuklar deneme hatasının küçültülmesi için uygulama dışı bırakılmış, her bir kemoterapi ajanı ve taşıt kontrol grupları 6 kuyucuktan oluşmuştur. İnkübasyon sonrası hücre sağkalım (viyabilite) analizleri için MTT testi yapılmıştır. Bunun için 5 mg/ml dozunda hazırlanan “Yellow tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)” test solüsyonu 20 µl/kuyucuk olacak şekilde tüm kuyucuklara pipetlenmiştir. Daha sonra plateler 4 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrasında kuyucukların içindeki besi yerleri tamamen uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 200µl ultra püre DMSO (Merk, USA) eklenerek, karanlık koşulda inkübatörde 2-4 saat beklenmiştir. Bu süre sonunda plateler Multiskan GO mikroploka okuyucu (Thermo Scientific, USA) ile 492, 570 ve 650 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunmuştur. Taşıt made uygulanan kontrol grubundan elde edilen değer %100 canlılık olarak baz alınarak karşılaştırmalı canlılık oranı şeklinde belirlenmiştir. Kontrol ve deneme gruplarında her bir tümör hücre serisi ve kemoterapi ajanlar için IC50 sonuçları SPSS 20.0 paket program ile probit analizi kullanılarak istatistikleri hesaplanmıştır.

## BULGULAR

Çalışma kapsamında Dox uygulaması sonrasında HeLa hücre serisinde MTT testi sonucu elde edilen % hücre canlılığı ve probit analizi kullanılarak hesaplanan IC50 değeri, çalışma yapılan 96 kuyucuklu kültür kaplarının resimleri ve kontrole kıyasla istatistik analizleri de içerecek şekilde Şekil 1’de verilmiştir. Elde edilen veriler HeLa hücre hattına 48 saat Dox uygulaması sonucu IC50 değeri 137.6 nM olarak bulunmuştur. 24 saat Dox uygulamasında IC50 değeri bulunamamıştır. Doz arttıkça hücre proliferasyonunda anlamlı azalmaların olduğu gözlemlenmiştir. 100.000 hücre ekimi ile başlanan uygulama da 1000 µM

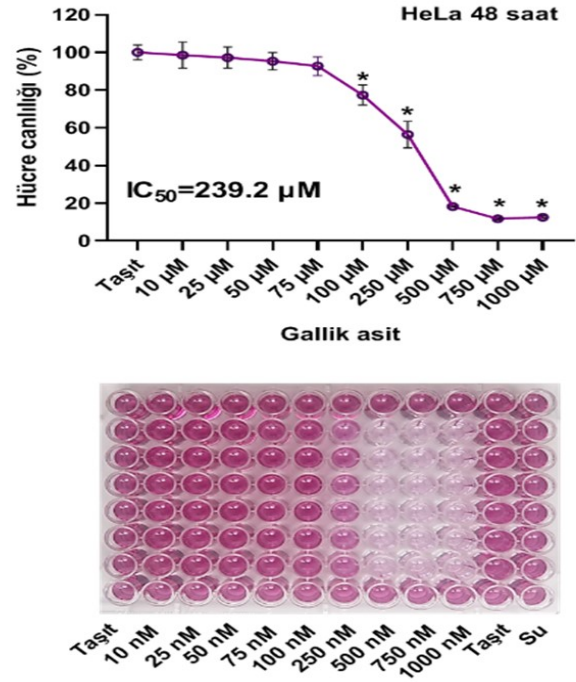
konsantrasyondaki Dox uygulamasında hücre sayısı 62.7450 olarak elde edilmiştir (Tablo 1). İstatistiksel analiz sonucu IC50 değeri bulunduktan sonra 25 nM Dox uygulamasından sonra hücre canlılığının taşıt grubuna kıyasla anlamlı şekilde düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** HeLa serviks adenokarsinoma hücre serisinde 10-1000 nM konsantrasyon aralığında seri sulandırım ile elde edilmiş 9 farklı konsantrasyonda, 48 saat süresince Dox uygulamasının taşıt kontrol grubuna kıyasla % hücre canlılığına etkisi ve kemoterapi ajanının IC50 değeri (n=6; veriler: ortalama ± standart sapma değerleridir, inhibisyon konsantrasyon (IC) değerleri probit analiz ile hesaplanmıştır. \*Veriler kontrole kıyasla istatistik olarak anlamlıdır, tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤ 0.05.

**Tablo 1:** HeLa serviks adenokarsinoma hücre serisinde 0.5-50 µM konsantrasyon aralığında seri sulandırım ile elde edilmiş 9 farklı konsantrasyonda, 48 saat süresince Doxorubicin uygulaması sonrası elde edilen % hücre canlılığı, standart sapma ve standart hata değerleri, % 95 güven aralığı ve minimum maksimum değerler.

Hela-Doxorubicin	N	Hücre canlılığı (%)	Std.sapma	Std. Hata	95% güven aralığı		Minimum	Maksimum	
					Alt sınır	Üst sınır			
48 s	Taşıt	6	100,0000	6,46820	2,64063	93,2120	106,7880	92,56	108,61
	10,00	6	96,4464	4,09473	1,67167	92,1492	100,7435	92,30	102,73
	25,00	6	93,0628	2,41872	0,98744	90,5245	95,6011	89,81	96,42
	50,00	6	79,7989	2,52641	1,03140	77,1476	82,4502	76,85	83,83
	75,00	6	71,0333	5,72947	2,33904	65,0206	77,0460	61,96	79,67
	100,00	6	66,9512	1,19659	0,48851	65,6954	68,2069	65,24	68,85
	250,00	6	19,5875	1,13897	0,46498	18,3923	20,7828	17,64	20,81
	500,00	6	13,7802	0,84165	0,34360	12,8970	14,6635	12,92	14,98
	750,00	6	10,2084	0,26719	0,10908	9,9280	10,4888	9,73	10,44
	1000,00	6	8,5196	0,87252	0,35620	7,6040	9,4353	7,56	10,06



**Şekil 2.** HeLa serviks adenokarsinoma hücre serisinde 10-1000 µM konsantrasyon aralığında seri sulandırım ile elde edilmiş 9 farklı konsantrasyonda, 48 saat süresince GA uygulamasının taşıt kontrol grubuna kıyasla % hücre canlılığına etkisi ve GA'in IC50 değeri (n=6; veriler: ortalama ± standart sapma değerleridir, inhibisyon konsantrasyon (IC) değerleri probit analiz ile hesaplanmıştır. \*Veriler kontrole kıyasla istatistik olarak anlamlıdır, tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤ 0.05.

GA uygulaması sonrasında HeLa hücre serisinde MTT testi sonucu elde edilen % hücre canlılığı ve probit analizi kullanılarak hesaplanan IC50 değeri, çalışma yapılan 96 kuyucuklu kültür kaplarının resimlerini ve kontrole kıyasla istatistik analizleri de içerecek şekilde Şekil 2'de verilmiştir. 48 saatlik GA uygulaması sonucu IC50 değeri 239.2  $\mu$ M olarak bulunmuştur (Tablo 2).

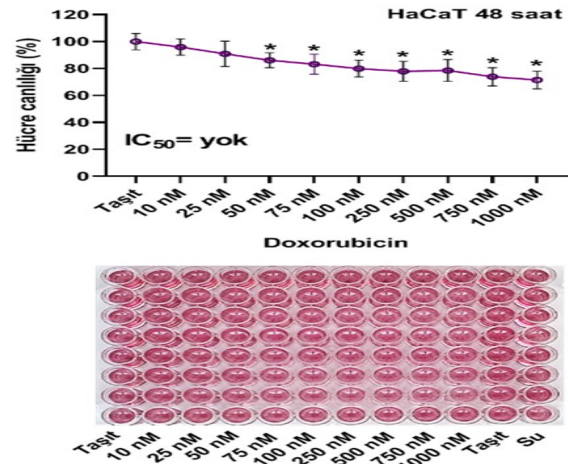
**Tablo II:** HeLa serviks adenokarsinoma hücre serisinde 10-1000  $\mu$ M konsantrasyon aralığında seri sulandırım ile elde edilmiş 9 farklı konsantrasyonda, 48 saat süresince GA uygulaması sonrası elde edilen % hücre canlılığı, standart sapma ve standart hata değerleri, % 95 güven aralığı ve minimum maksimum değerleri.

Hela-GA		N	Hücre canlılığı (%)	Std.sapma	Std. Hata	95% güven aralığı		Minimum	Maksimum
						Alt sınır	Üst sınır		
48 s	Tasit	6	100,0000	3,97461	1,62263	95,8289	104,1711	93,08	103,44
	10 $\mu$ M	6	98,5973	6,98708	2,85247	91,2648	105,9298	90,39	109,39
	25 $\mu$ M	6	97,2099	5,60783	2,28939	91,3249	103,0950	89,71	105,58
	50 $\mu$ M	6	95,3560	4,58228	1,87071	90,5472	100,1648	88,69	100,90
	75 $\mu$ M	6	92,7164	4,97034	2,02913	87,5003	97,9324	84,00	99,26
	100 $\mu$ M	6	77,3941	5,32421	2,17360	71,8067	82,9815	70,87	85,43
	250 $\mu$ M	6	56,4180	7,07331	2,88767	48,9951	63,8410	47,77	68,64
	500 $\mu$ M	6	18,2781	0,46294	0,18899	17,7923	18,7639	17,46	18,78
	750 $\mu$ M	6	11,7894	0,52793	0,21553	11,2354	12,3435	10,83	12,25
	1000 $\mu$ M	6	12,5936	0,51373	0,20973	12,0545	13,1327	11,86	13,24

Dox ve GA uygulamalarının sağlıklı hücre serisine etkisi de analiz edilmiş ve her iki ajanın uygulamaları sonrasında HaCaT hücre serisinde MTT testi sonucu elde edilen % hücre canlılığı ve probit analizi kullanılarak hesaplanan IC50 değerleri, çalışma yapılan 96 kuyucuklu kültür kaplarının resimlerini ve kontrole kıyasla istatistik analizleri de içerecek şekilde Şekil 3 ve 4'te verilmiştir.

HaCaT hücre hattına 24 ve 48 saat Dox uygulaması sonucu IC50 değeri bulunamamıştır. Doz arttıkça hücre proliferasyonunda anlamlı azalmaların olduğu gözlemlenmiştir. 100.000 hücre ekimi ile başlanan uygulama da 1000  $\mu$ M konsantrasyondaki Dox uygulamasında hücre sayısı 85.4770 olarak elde edilmiştir (Tablo 3). İstatistiksel analiz sonucu IC50 değeri bulunduktan sonra 50 nM Dox uygulamasından sonra hücre canlılığının taşıt grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3).

Daha sonra tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi ile taşıt grubu ile GA farklı konsantrasyonları arasındaki istatistiksel anlamlılık  $P \leq 0.05$ ' göre hesaplanmıştır. Sonuç olarak 48 saatlik GA uygulaması ile 100  $\mu$ M konsantrasyondan sonra hücre canlılığının anlamlı olacak şekilde düştüğü gözlemlendi (Şekil 2).



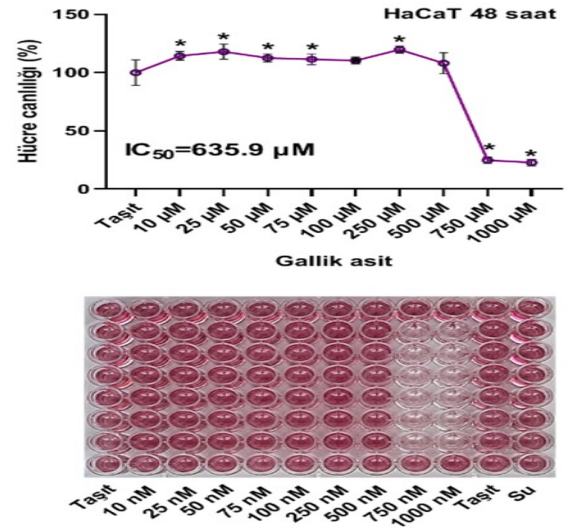
**Şekil 3.** HaCaT insan sağlıklı dermal keratinosit hücre serisinde 10-1000 nM konsantrasyon aralığında seri sulandırım ile elde edilmiş 9 farklı konsantrasyonda, 48 saat süresince Dox uygulamasının taşıt kontrol grubuna kıyasla % hücre canlılığına etkisi ve Dox'ın IC50 değeri (n=6; veriler: ortalama  $\pm$  standart sapma değerleridir, inhibisyon konsantrasyon (IC) değerleri probit analiz ile hesaplanmıştır. \*Veriler kontrole kıyasla istatistik olarak anlamlıdır, tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi,  $P \leq 0.05$ ).

**Tablo III:** HaCaT insan sağlıklı dermal keratinosit hücre serisinde 10-1000 nM konsantrasyon aralığında seri sulandırım ile elde edilmiş 9 farklı konsantrasyonda, 48 saat süresince Doxorubicin uygulaması sonrası elde edilen % hücre canlılığı, standart sapma ve standart hata değerleri, %95 güven aralığı ve minimum maksimum değerleri.

HaCaT-Doxorubicin	N	Hücre canlılığı (%)	Std.sapma	Std. Hata	95% güven aralığı		Minimum	Maksimum	
					Alt sınır	Üst sınır			
48 s	Tasit	6	100,0000	6,03897	2,46540	93,6625	106,3375	92,31	109,71
	10 nM	6	95,9772	5,99167	2,44609	89,6894	102,2651	88,53	105,54
	25 nM	6	90,9488	9,36595	3,82363	81,1198	100,7777	80,83	107,52
	50 nM	6	86,1973	5,56448	2,27169	80,3578	92,0369	77,12	92,36
	75 nM	6	83,2182	7,41721	3,02806	75,4343	91,0021	72,61	90,83
	100 nM	6	80,0000	6,29631	2,57046	73,3924	86,6076	71,61	84,77
	250 nM	6	77,9658	7,42914	3,03293	70,1694	85,7622	67,58	89,65
	500 nM	6	78,5389	8,08976	3,30263	70,0492	87,0286	67,22	89,08
	750 nM	6	73,9127	6,76009	2,75979	66,8184	81,0070	65,56	84,82
1000 nM	6	71,5142	6,54875	2,67352	64,6417	78,3867	59,57	76,83	

GA uygulamalarının sağlıklı hücre serisine etkisi de analiz edilmiş ve HaCaT hücre serisinde MTT testi sonucu elde edilen % hücre canlılığı ve probit analizi kullanılarak hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri, çalışma yapılan 96 kuyucuklu kültür kaplarının resimlerini ve kontrole kıyasla istatistik analizleri de içerecek şekilde Şekil 4'te verilmiştir.

HaCaT hücre hattına 24 saat GA uygulaması sonucu IC<sub>50</sub> değeri bulunamamıştır. 48 saat GA uygulaması ile HaCaT hücre hattına ait canlılık oranını etkileyen IC<sub>50</sub> 635.9 µM olarak bulunmuştur. Doz arttıkça hücre proliferasyonunda anlamlı azalmaların olduğu gözlemlenmiştir. 100.000 hücre ekimi ile başlanan uygulama da 1000 µM konsantrasyondaki GA uygulamasında hücre sayısı 22.7506 olarak elde edilmiştir (Tablo 4). İstatistiksel analiz sonucu IC<sub>50</sub> değeri bulunduktan sonra 10 µM GA uygulamasından sonra hücre canlılığının taşıt grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4).



**Şekil 4.** HaCaT insan sağlıklı dermal keratinosit hücre serisinde 10-1000 µM konsantrasyon aralığında seri sulandırım ile elde edilmiş 9 farklı konsantrasyonda, 48 saat süresince GA uygulamasının taşıt kontrol grubuna kıyasla % hücre canlılığına etkisi ve GA'nın IC<sub>50</sub> değeri (n=6; veriler: ortalama ± standart sapma değerleridir, inhibisyon konsantrasyon (IC) değerleri probit analiz ile hesaplanmıştır). \*Veriler kontrole kıyasla istatistik olarak anlamlıdır, tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P ≤ 0.05.

Elde edilen bulgular Gallik asidin servikal kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarıyla kombine edildiğinde teröpatik etkiyi artırabileceğini ve sağlıklı hücreler üzerinde



meydana gelen toksisiteyi azaltabileceğini göstermektedir. Gallik asidin doksorubisin ile sinerjistik etki sergileyebildiğini, aynı zamanda

doksorubisin toksisitesine karşı da önleyici rol oynayabileceğini göstermiştir.

**Tablo IV:** HaCaT insan sağlıklı dermal keratinosit hücre serisinde 10-1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında seri sulandırım ile elde edilmiş 9 farklı konsantrasyonda, 48 saat süresince Gallik asit uygulaması sonrası elde edilen % hücre canlılığı, standart sapma ve standart hata değerleri, % 95 güven aralığı ve minimum maksimum değerler.

HaCaT- GA	N	Hücre canlılığı (%)	Std.sapma	Std. Hata	95% güven aralığı		Minimum	Maksimum
					Alt sınır	Üst sınır		
Tasit	6	100,0000	10,99680	4,48943	88,4596	111,5404	85,15	111,95
10 $\mu\text{M}$	6	114,3502	3,71490	1,51660	110,4516	118,2487	108,98	119,30
25 $\mu\text{M}$	6	117,9023	6,51705	2,66057	111,0631	124,7415	110,84	128,81
50 $\mu\text{M}$	6	112,5675	3,44990	1,40841	108,9470	116,1879	108,10	118,53
75 $\mu\text{M}$	6	111,4394	4,57329	1,86704	106,6401	116,2388	105,21	118,88
100 $\mu\text{M}$	6	110,3601	2,98019	1,21666	107,2326	113,4876	107,49	114,58
250 $\mu\text{M}$	6	119,7337	2,94262	1,20132	116,6456	122,8218	115,77	122,78
500 $\mu\text{M}$	6	108,1040	8,99029	3,67027	98,6693	117,5388	97,51	120,55
750 $\mu\text{M}$	6	24,8341	2,73869	1,11806	21,9600	27,7082	22,37	29,99
1000 $\mu\text{M}$	6	22,7506	2,86627	1,17015	19,7426	25,7586	20,52	28,11

## TARTIŞMA

Kemoterapötik ilaçlar çok etkili olmalarına rağmen ciddi yan etkileri ve ilaç direnci gelişmesi bu ilaçların kullanımını sınırlamaktadır. Antikanser aktiviteye sahip doğal ürünlerin kullanılması bu sorunların kısmen üstesinden gelinmesine yardımcı olabilir. Bu çalışmada, GA'in, MTT yöntemi ile insan HeLa hücrelerinde Dox kombinasyonunun anti-kanser etkilerini güçlendirme yeteneğini araştırdık. Sonuçlarımız, MTT tahlili ile gruplar arasında en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiği için en umut verici kombinasyonun Dox ile GA uygulamasının olduğunu göstermektedir.

Daha önce yapılan in vitro çalışmalarda, çeşitli hücre hatlarında GA'nın sitotoksik etkisi araştırılmış ve Calu-6 (insan, Kafkas, akciğer, adenokarsinom), A 549 (adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücreleri), HeLa (insan epitelyal karsinomu) ve (HUVEC'ler) İnsan göbek kordonu endotel hücreleri için IC50'nin sırasıyla 10–50, 100–200, 80, 400  $\mu\text{M}$  olduğunu göstermiştir<sup>17-20</sup>. Bu sonuçlar, GA'in

tümör hücrelerinde nispeten yüksek bir seçicilikle hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada GA tedavisi, 48 saatte  $\sim 239.2 \mu\text{M}$  IC50 değeri ile HeLa hücrelerinin büyümesini doza bağlı bir şekilde azalttı. GA'in sitotoksik etkisi, HeLa hücreleri de dahil olmak üzere farklı kanser hücre hatlarında apoptoz indükleyici olarak tanınan pro-oksidan özelliği ile açıklanabilir<sup>21</sup>. Çalışmamızda görülen HeLa hücresindeki GA'nın IC50 değerleri arasındaki fark, MTT testinin kanser araştırmalarında 30 yıldır kullanılmasıyla açıklanabilir. Absorbans ölçümüne dayalı gerçekleşen analizde bazı hücre hatları dirençli yanıt verebildiği için aynı ölçümlerde dahi farklı sonuçlar elde edilebilmektedir<sup>22-24</sup>. Belirli bir kanser hücre hattına karşı belirli bir kimyasal bileşik için nadiren tutarlı bir IC50 değeri elde edilir. He ve ark.<sup>25</sup>, bu sorunu üreticiler arasındaki farklılıklara ve farklı laboratuvarlar tarafından kullanılan formüllere atfettiler. Hatta aynı laboratuvar içinde bile MTT testi sonuçları, farklı araştırmacılar arasında ve aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirilen farklı

deney tekrarları arasında değişken IC50 değerleri elde edilebildiğini bildirdiler. Bu tutarsızlık, IC50 değerlerinin hesaplanmasında temel olarak kullanılan kontrol kuyucuklarındaki değişkenlik ile açıklanabilir. Bu varyasyonlar ilk ekilen hücre yoğunluğuna ve hücre hattının proliferasyon potansiyeline bağlıdır<sup>25</sup>. Ayrıca HaCaT-GA uygulamasında 10uM ve 500uM konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı absorbanstaki farklılıktan dolayı %100'ün üzerinde çıkmıştır. Bazı durumlarda hücre yoğunluğu ve absorbanstaki farkı hücre canlılığını eksi yada artı yönde etkileyebilmektedir.

Çalışmamızda, MTT testinin sonuçlarıyla gösterildiği gibi GA kaynaklı apoptoz indüklendi. Gallik asidin apoptozu indüklemesindeki rolünü anlamak için P53, Bcl-2 ve Caspase-3 gibi apoptotik belirteçlerle ekspresyonlarının bakılması gerekmektedir. Ayrıca GA'nın Dox ile birlikte işlenmesinin güçlendirici etkisi, Sánchez-Carranza ve ark.<sup>26</sup> yapmış olduğu çalışma sonuçlarıyla paralellik gösterdi. Yapılan çalışmada Paklitaksel'in sitostatik etkisinin, insan yumurtalık karsinomu A2780 hücreleri (ilaca duyarlı) ve A2780AD hücreleri (çoklu ilaca dirençli yumurtalık kanseri) modellerinde, GA ile birlikte tedavi yoluyla arttığını bildirmiştir. Sánchez-Carranza ve ark., bu sonucu GA'nın Paklitaksel kaynaklı G2/M faz tutuklamasını güçlendirme yeteneği ile açıkladı. İlaça dirençli hücre hattını kullanarak, proliferasyon inhibisyonuna ve G2/M fazı durmasına GA'le tetiklenen reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminin aracılık ettiğini de gösterdiler. Ayrıca Paklitaksel'in oksijen türleri aracılı inhibisyonu, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazların (ERK'ler) aktivasyonunu tetiklemektedir<sup>27</sup>.

### SONUÇLAR

Mevcut çalışma, Dox ve GA kombinasyonunun rahim ağzı kanseri tedavisi için umut verici bir protokol olabileceğini ve yaygın olarak kullanılan mevcut rejim olan

Paklitaksel/Karboplatin'in alternatifi olabileceğini düşündürmektedir. Dox/GA kombinasyonu, mevcut protokollere göre daha yüksek etkinlik, daha düşük doz ve daha az yan etki gibi bir dizi avantaj sunar. Dox/GA kombinasyon tedavisini değerlendirmek için hücre kültürü, hayvan modelleri ve son olarak klinik deneylerde daha ayrıntılı mekanik ve etkililik çalışmaları yapılması önerilir.

**Etik Kurul Onayı:** Ticari olarak temin edilen hücre hatları in vitro çalışma olarak kullanıldığı için etik onay gerekmemektedir.

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma herhangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

**Declaration of Conflicting Interests:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** No financial support was received.

### KAYNAKLAR

1. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheet/s/detail/cancer>. Erişim: 16.04.2023.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394-424.
3. Mirili C, Yılmaz A, Bilici M, et al. Long-Term Follow-Up Outcomes of Cervical Cancer Patients: A Single Center Experience from the East Anatolian Region of Turkey. *Dicle Tıp Dergisi* 2019; 46(4): 857-865.
4. Aborehab NM, Osama N. Effect of Gallic acid in potentiating chemotherapeutic effect of Paclitaxel in HeLa cervical cancer cells. *Cancer Cell Int* 2019; 19: 154.
5. Gong C, Xie Y, Zhao Y, et al. Comparison of two regimens of weekly paclitaxel plus gemcitabine in patients with metastatic breast cancer: propensity score-matched analysis of real-world data. *Ther Adv Drug Saf* 2022; 13.
6. Bayat Mokhtari R, Baluch N, Morgatskaya E, et al. Human bronchial carcinoid tumor initiating cells are targeted by the combination of acetazolamide and sulforaphane. *BMC Cancer* 2019; 19(1): 864.



7. Frazier AL, Stoneham S, Rodriguez-Galindo C, et al. Comparison of carboplatin versus cisplatin in the treatment of paediatric extracranial malignant germ cell tumours: a report of the Malignant Germ Cell International Consortium. *Eur J Cancer* 2018; 98: 30-7.
8. Jiang S, Pan AW, Lin TY, et al. Paclitaxel enhances carboplatin-dna adduct formation and cytotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2015; 28(12): 2250-2.
9. Bhattacharya S, Muhammad N, Steele R, et al. Bitter Melon enhances natural killer-mediated toxicity against head and neck cancer cells. *Cancer Prev Res* 2017; 10(6): 337-44.
10. Wright GD. Opportunities for natural products in 21(st) century antibiotic discovery. *Nat Prod Rep* 2017; 34(7): 694-701.
11. Yao H, Liu J, Xu S, et al. The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2017; 12(2): 121-40.
12. Muhammad N, Steele R, Isbell TS, et al. Bitter melon extract inhibits breast cancer growth in preclinical model by inducing autophagic cell death. *Oncotarget* 2017; 8(39): 66226-36.
13. Bhattacharya S, Muhammad N, Steele R, et al. Immunomodulatory role of bitter melon extract in inhibition of head and neck squamous cell carcinoma growth. *Oncotarget* 2016; 7(22): 33202-9.
14. De A, De A, Sharma R, et al. Sensitization of Carboplatinum- and Taxol-Resistant High-Grade Serous Ovarian Cancer Cells Carrying p53, BRCA1/2 Mutations by *Emblica officinalis* (Amla) via Multiple Targets. *J Cancer* 2020; 11(7): 1927-1939.
15. Sourani ZM, Pourgheysari BP, Beshkar PM, et al. Gallic Acid inhibits proliferation and induces apoptosis in lymphoblastic leukemia cell line (C121). *Iran J Med Sci* 2016; 41(6): 525-30.
16. He Z, Chen AY, Rojanasakul Y, et al. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 2016 ; 35(1): 291-7.
17. Jiang Y, Pei J, Zheng Y, et al. Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. *Chin J Integr Med* 2022; 28(7): 661-671.
18. Park WH, Kim SH. MAPK inhibitors augment gallic acid-induced A549 lung cancer cell death through the enhancement of glutathione depletion. *Oncol Rep* 2013; 30(1): 513-9.
19. Al Balushi N, Hassan SI, Abdullah N, et al. Addition of Gallic Acid Overcomes Resistance to Cisplatin in Ovarian Cancer Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2022; 23(8): 2661-2669.
20. Park WH. Gallic acid induces HeLa cell death via increasing GSH depletion rather than ROS levels. *Oncol Rep* 2017; 37(2): 1277-83.
21. Dorniani D, Saifullah B, Barahuie F, et al. Graphene oxide-Gallic Acid nanodelivery system for cancer therapy. *Nanoscale Res Lett* 2016; 11(1): 491.
22. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, et al. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol* 2017; 1601: 1-17.
23. Yan XX, Zhao YQ, He Y, et al. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of botanical drugs derived from the indigenous cultivated medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Front Pharmacol* 2023; 14: 1100825.
24. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, et al. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* 2018; 120(3): 159-67.
25. He Y, Zhu Q, Chen M, et al. The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; 7(43): 70803-21.
26. Sanchez-Carranza JN, Diaz JF, Redondo-Horcajo M, et al. Gallic acid sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma cells through an increase in reactive oxygen species and subsequent downregulation of ERK activation. *Oncol Rep* 2018; 39(6): 3007-14.
27. Liu Y, Zhao R, Qin X, et al. Cobimetinib Sensitizes Cervical Cancer to Paclitaxel via Suppressing Paclitaxel-Induced ERK Activation. *Pharmacology* 2022; 107(7-8): 398-405.