



E-ISSN: 2717-8633

Sayı(Number) 13, Ağustos(August) 2026

ARAŞTIRMA MAKALESİ/RESEARCH ARTICLE

Geliş Tarihi(Receive Date): 22.01.2026

Kabul Tarihi(Accepted Date): 06.07.2026

**3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid ve
4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiklerinin parental ve
Bortezomib-Dirençli prostat kanseri hücre hatlarındaki etkileri**

Nada Ahmed Khalaf Dulaimi^a, Azmi Yerlikaya^b, Emrah Okur^{c*}

^aKütahya Dumlupınar Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 43100, Kütahya, Türkiye,
ORCID: 0009-0003-6824-7018

^bKütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 43100, Kütahya, Türkiye, ORCID: 0000-0002-0678-0701

^cKütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 43100, Kütahya, Türkiye, ORCID:0000-0001-5606-7042

Öz

Kemoterapi kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir metod olmakla birlikte hücrelerin zamanla kemoterapötik ilaçlara karşı direnç oluşturmaları (kemoresistans) önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bortezomib çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan bor elementi içeren bir bileşiktir. Ancak pek çok çalışmada bortezomib muamelesine cevap olarak hücrelerde hızlı bir şekilde direnç oluştuğu gösterilmiştir. Bu çalışmada PC3 insan prostat kanseri hücre hattı (PC3-Parental) ve daha önceki çalışmalarda bortezomib direnci kazandırılmış PC3 hücre hatları (PC3-Dirençli) kullanılmıştır. Çalışma kapsamında PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücreler üzerinde diğer bazı bor içeren bileşiklerin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 48 saat süreyle 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid ile muamele sonrasında IC₅₀ değeri, PC3-Parental hücrelerde 702.7 µM; PC3-Dirençli hücrelerde ise 1156 µM olarak tespit edilmiştir. 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiğinin 48 saat muamele sonrasında IC₅₀ değeri, PC3-Parental hücrelerde 117.3 µM; PC3-Dirençli hücrelerde ise 226.3 µM olarak bulunmuştur. Özellikle 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiği daha düşük bir IC₅₀ değerine sahip olduğu için, daha detaylı analizler ile etkilerinin araştırılması faydalı olacaktır. Ayrıca, farklı ilaç kombinasyonu deneyimleri ile daha düşük konsantrasyonlarda daha etkili bir kanser tedavi yaklaşımı geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid; 4-Aminocarbonylphenylboronic acid; bortezomib; prostat kanseri.

* Corresponding author

E-mail address: emrah.okur@dpu.edu.tr

Dulaimi, N. A. K., Yerlikaya, A. & Okur, E., 2026, *Journal of Scientific Reports-C*, 013, 41-56

The effects of 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid and 4-Aminocarbonylphenylboronic acid compounds on parental and Bortezomib-Resistant prostate cancer cell lines

Abstract

Although chemotherapy is a widely used method in cancer treatment, the development of resistance to chemotherapeutic agents over time (chemoresistance) constitutes a major problem. Bortezomib is a boron element-containing compound used in the treatment of various cancer types. However, many studies have demonstrated that cells rapidly develop resistance in response to bortezomib treatment. In this study, the PC3 human prostate cancer cell line (PC3-Parental) and previously established bortezomib-resistant PC3 cell lines (PC3-Resistant) were used. Within the scope of the study, the cytotoxic effects of several other boron-containing compounds were investigated on PC3-Parental and PC3-Resistant cells. After 48 hours of treatment with 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid, the IC_{50} value was determined as 702.7 μM in PC3-Parental cells and 1156 μM in PC3-Resistant cells. Following 48 hours of treatment with 4-Aminocarbonylphenylboronic acid, the IC_{50} values were found to be 117.3 μM in PC3-Parental cells and 226.3 μM in PC3-Resistant cells. Since 4-Aminocarbonylphenylboronic acid exhibited a lower IC_{50} value, further detailed analyses would be beneficial to investigate its effects more comprehensively. Additionally, it is thought that a more effective cancer treatment strategy at lower concentrations could be developed through trials of different drug combinations.

Keywords: 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid; 4-Aminocarbonylphenylboronic acid; bortezomib; prostate cancer.

1. Giriş

Kanser; vücutta oluşan kötü huylu (malignant) tümörleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Çok hücreli organizmalarda her hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı organizmanın genel gereksinimleri doğrultusunda düzenlenir. Kanser hücrelerinde bu olayları düzenleyen mekanizmalar ortadan kalkmaktadır. Hücreler kontrolsüz biçimde bölünerek çoğalmaya başlamakta ve tümör sonunda vücudun diğer bölgelerine yayılarak normal doku ve organların işlevini etkilemektedir. Kanser hastalığı, tüm dünyada hastalık kaynaklı insan ölümlerinin ikinci nedeni olarak bilinmektedir [1]. Kemoterapi, kanser hücrelerinin yok edilmesi veya çoğalmalarının kontrol altına alınması için antikanserojenik ilaçların kullanıldığı kanser tedavi çeşitidir. Kanser ile bağlantılı insan ölümlerinin yaklaşık olarak %90'ının metastaz ile ilişkili olduğunu bilinmektedir. Bu sebeple metastatik sürecin mekanizmalarını hedefleyerek kanserin yayılımının önlenmesi, kanser tedavisinde önemli ilerlemeler sağlayacaktır [2, 3]. Bununla birlikte zamanla artmış ilaç dışı atımı, azalmış ilaç alımı, ilaç hedeflerinin miktar veya aktivitesindeki değişiklikler, artmış DNA onarımı gibi birincil veya kazanılmış direnç mekanizmaları nedeniyle konvansiyonel kemoterapötik ilaçlara karşı direnç (kemoresistans) gelişmektedir [3, 4]. Kemoresistans gelişimi, lokal ya da yayılmış kanserlerin tedavisi sırasında önemli bir sorun oluşturmaktadır. Daha önce yapılan birçok çalışma, 26S proteozomun kanser tedavi stratejilerinde kritik bir hedef olduğunu göstermiştir. Örneğin, iyi huylu (benign) solid tümörlerle karşılaştırıldığında primer meme kanseri hücrelerinin %90'ından fazlasında proteozomal alt birimlerin yanı sıra proteozom aktivitesinin 2-32 kat arttığı gösterilmiştir [5]. Ayrıca çok sayıda çalışma, proteozom inhibitörü bortezomibin tek başına birçok kanser hücre hattında belirgin büyüme baskılayıcı ve apoptotik etki gösterdiğini ve diğer sitotoksik ajanlarla kombinasyonu halinde umut verici antitümör aktivite sergilediğini ortaya çıkarmıştır [6- 9]. Bortezomib (Velcade ya da PS-341 olarak da bilinir), kemoterapide kullanılan bor elementi içeren bir kanser tedavisi ilacıdır. Bortezomibin pek çok *in vitro* ve *in vivo* deney modelinde birçok açıdan tümör hücre çoğalmasını, adhezyon ve metastaz oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca prostat, lösemi, manto hücreli lenfoma, miyeloma, yumurtalık, pankreas, baş ve

boyun, küçük hücreli olmayan akciğer ve kolon kanseri gibi birçok tümör hücresinde gelişimi engelleyici ya da azaltıcı anti-tümör aktivite meydana getirdiği belirlenmiştir [10- 15]. Ancak daha önce gerçekleştirilen birçok çalışmada, bortezomib muamelesine cevap olarak hızlı bir şekilde ilaç direncinin geliştiği tespit edilmiştir [16, 17]. Prostat kanseri, dünya çapında erkekler arasında en sık görülen malignant kanser türlerinden birisidir ve yüksek insidans göstermesi nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkekleri en çok etkileyen kanser türleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır [18]. Prostat kanseri için cinsiyetten sonra ileri yaş, aile öyküsü, ırk ve çevresel faktörler başlıca risk faktörleri arasında yer almaktadır [19]. PC3 insan prostat kanseri hücre hattı, ilk kez 1979 yılında IV. derece metastatik prostat adenokarsinomu hastalığına sahip 62 yaşındaki Kafkasyalı bir erkekten elde edilmiştir [20- 22]. PC3 hücre hattının; ilaç testleri, hücresel süreçlerin anlaşılması, kanser çalışmaları, genetik ve biyoteknoloji dahil olmak üzere tıbbi araştırma alanlarında yaygın olarak kullanımı mevcuttur. Prostat kanseri ve gelişmiş formlarının anlaşılmasında önemli bir yardımcı olmaya devam etmektedir. PC3 hücre hattı, ileri evre ve tedaviye dirençli prostat kanseri formlarının modellenmesi açısından uygun hale getiren çeşitli ayırt edici özellikleri nedeniyle prostat kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [23]. Ayrıca, PC3 hücreleri yüksek metastatik potansiyele ve invazivliğe sahip oldukları için, tümör progresyonu ve metastaz süreçlerinin incelenmesi için değerli modeller olarak karşımıza çıkmaktadır [20]. Apoptozise karşı direnç gösterme özellikleri, PC3 hücrelerinin sitotoksik strese rağmen hayatta kalmalarını sağlamaktadır. Bu özellik genellikle agresif ve kemoterapi ilaçlarına dirençli tümörlerde gözlemlenmektedir [24]. Bu sebeple PC3 hücreleri, dirençli kanser fenotiplerini hedefleyen yeni terapötik bileşiklerin değerlendirilmesinde önemli bir model haline gelmektedir [10, 25]. Sonuç olarak, androjen bağımsızlığı, yüksek metastatik potansiyel, invazivlik, apoptozise ve proteozom inhibitörlerine karşı direnç gösterme özellikleri sayesinde PC3 hücre hattı, ileri evre prostat kanserine yönelik tedavi stratejilerinin araştırılmasında güvenilir ve uygun bir *in vitro* model olarak kabul edilmektedir [23].

2. Materyal ve Metod

2.1. Materyal

DMEM besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ve fetal bovine serum (FBS), Capricorn Scientific firmasından; 10X tripsin, Penisilin/Streptomisin, sodyum bikarbonat, HCl (hidroklorik asit), 4-Aminocarbonylphenylboronic Acid (683876-1G), MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], Sigma-Aldrich Inc. firmasından (St. Louis, MO USA); Bortezomib (Velcade ya da PS-341), Millenium Pharmaceuticals Inc.'dan; 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic Acid (sc-288640-1 gr), Chem Cruz (Santa Cruz) firmasından; 0.22 µm filtrasyon sistemi, Millipore firmasından satın alınmıştır. PC3 insan prostat kanseri hücre hattı (PC3-Parental, PC3-P) (ATCC Cat# CRL-1435, RRID:CVCL_0035) ilk olarak Prof. Dr. Serap Kuruca Erdem'den (İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye) temin edilmiş ve daha sonra laboratuarda çoğaltılıp stoklanması sağlanmıştır. Bortezomibe dirençli PC3 insan prostat kanseri hücre hattı (PC3-Dirençli, PC3-R) ise Yerlikaya ve Okur tarafından daha önceki çalışmalarda elde edilmiştir [3].

2.2. DMEM Besiyeri Hazırlama

13.4 gr DMEM besiyeri yaklaşık olarak 900 ml otoklavlanmış dH₂O içinde çözünür ve üzerine 50 ml steril %7.4 NaHCO₃ (sodyum bikarbonat) ilave edilir. pH metre kalibre edildikten sonra, çözeltinin pH'sı 1N HCl kullanılarak 7.4'e ayarlanır ve tamamen çözünmesi sağlanır. Daha sonra 10 ml penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı eklenir ve besiyerinin son hacmi otoklavlanmış dH₂O ile 1 litre olacak şekilde ayarlanır. Devamında hazırlanan besiyeri, biyolojik güvenlik kabini içerisinde, tek kullanımlık 0.22 µm gözenekli filtre içeren Millipore filtrasyon sistemi kullanılarak filtre edilir. Filtrasyondan sonra, filtrelenen besiyerinin %90'lık kısmına (900 ml) %10 oranında FBS (100 ml) ilave edilir ve besiyeri +4°C'de saklanır [3].

2.3. PC3-Dirençli Hücrenin Elde Edilmesi ve Direnç Fenotipinin Korunması

Çalışmada kullanılan PC3-Dirençli hücreler daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında dirençli PC3 hücrelerini elde etmek amacıyla, hücrelere 6 ay boyunca kademeli olarak artan bortezomib konsantrasyonları uygulanmıştır. Hücreler ilk olarak 1 nM bortezomib ile yaklaşık %70 yoğunluğa ulaşınca kadar 3 gün boyunca muamele edilmiştir. Daha sonra, aynı konsantrasyonda bir sonraki iki pasaj boyunca muameleye devam edilmiştir. Bu pasajların ardından, bortezomib konsantrasyonu sonraki üç pasaj için 2.5 nM'a yükseltilmiştir. Muamele; benzer şekilde 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM ve 80 nM konsantrasyonları için sürdürülmüştür. Bazı aşamalarda, bortezomibin yüksek sitotoksitesi nedeniyle hücreler yaklaşık %70 yoğunluğa ulaşamamış; bu durumda konsantrasyon bir önceki düzeye düşürülmüş ve hücrelerin yüksek proliferasyon hızlarını yeniden kazanmalarına izin vermek amacıyla muameleye bu şekilde devam edilmiştir. Parental hücreler ise, en uygun deneysel kontrolü sağlamak amacıyla, takip eden deneyler için paralel olarak büyütülmüş ve pasajlanmıştır [3]. PC3-Dirençli hücrelerin direnç fenotipinin korunması amacıyla; PC3-Dirençli hücrelere stoktan çıkarıldıktan sonra ve her pasaj işlemi sonrasında 5 nM bortezomib uygulanmıştır.

2.4. Hücre Kültürlerinin Çoğaltılması

PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücreler; %10 FBS destekli DMEM besiyeri içerisinde, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık ortamı sağlayan CO₂ inkübatöründe çoğaltılmışlardır. Stok hücre kültürlerinin çoğaltılması için 25 cm² steril corning flasklar; deney hücre kültürlerinin çoğaltılması için ise 96'lık mikrolateler (96 well/plate) kullanılmıştır [3, 26].

2.5. Hücre Pasajı

Hücre pasajı; genellikle PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücreler büyümenin logaritmik fazındayken (yaklaşık olarak yüzde 70 oranında yoğunlukta) gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle hücreler 1 ml PBS (phosphate buffered saline; fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanır ve sonrasında yaklaşık 5 saniye süreyle 2 ml 1X tripsin ile kaldırılır. Tripsin aspire edildikten sonra taze DMEM besiyeri kullanılarak uygun dilüsyon oranlarında yeni flaslara hücreler ekilir (ilaveten PC3-Dirençli hücrelere 5 nM bortezomib verilir). Hücreler inverted mikroskop altında incelenir ve %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık sağlayan CO₂ inkübatörüne kaldırılır. Hücreler ortalama olarak her üç günde bir yaklaşık yüzde 70 yoğunluğa ulaştıkları için, hücre pasajı işlemi periyodik olarak üç günde bir olacak şekilde gerçekleştirilir [3, 27].

2.6. Hücre Sayımı

Hücre ekimi işleminin öncesinde; PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelerin hemasitometre (thoma lamı) yardımıyla sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı işlemi için, hemasitometre üzerine lamel yerleştirildikten sonra lamelin altından pipet yardımıyla yaklaşık 30 µl hücre içeren besiyeri yavaşça pipetlenir. Daha sonra inverted mikroskop altında 10X büyütme kullanılarak hücrelerin sayımı gerçekleştirilir. Hücre sayımı için, hemasitometre üzerindeki büyük kareler sayılır ve sayım sonuçlarının ortalaması hesaplanır. Sonrasında mililitredeki hücre sayısını bulmak amacıyla bu ortalama sayı 10⁴ ile çarpılır [3, 27].

2.7. Hücre Ekimi

Hücre sayımı sonrasında; PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelere 48 saat süreyle bazı bor içeren bileşikler üç tekrarlı (n = 3) olacak şekilde uygulanacağı için, 96 kuyulu mikrolate (96 well/plate) kullanılmıştır. Her bir kuyuda 100 µl DMEM besiyeri içerisinde 10000 hücre olacak şekilde hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Eşit sayıda ekim

gerçekleştirilmesi adına hücreli besiyeri her defasında hafifçe karıştırılır ve her bir kuyuya 100 µl ilave edilir. Daha sonra mikropate 24 saat süreyle %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık sağlayan CO₂ inkübatörüne kaldırılır [3, 9, 26].

2.8. Bazı Bor İçeren Bileşiklerin PC3-Parental ve PC3-Dirençli Hücrelere 48 Saat Süreyle Uygulanması

Süre sonunda mikropate CO₂ inkübatöründen çıkarılır, hücrelerin eşit çoğalıp çoğalmadığının ve kontaminasyon olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla 10X büyütme kullanılarak inverted mikroskop ile incelenir. Öncelikle 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid, 4-Aminocarbonylphenylboronic acid ve bortezomib'e ait stoklar kullanılarak deney için belirlenen konsantrasyonlarda seyreltme işlemi yapılır. Bileşiklerin her birisi farklı çözücülerde hazırlandığı için; çözücünün hücre üzerinde meydana getirebileceği sitotoksik etkiler göz önüne alınarak her bir bileşik için uygulanan en yüksek konsantrasyona ilave edilen çözücü miktarını içerecek şekilde ayrı ayrı kontrol numuneleri hazırlanır. Bu sebeple 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid için kontrol numunesine dH₂O, 4-Aminocarbonylphenylboronic acid için kontrol numunesine DMSO (final konsantrasyonu, %0.5 oranında) ve bortezomib için kontrol numunesine izotonik solüsyon ilave edilir. Daha sonra kuyulardaki besiyeri aspire edilir ve her bir kuyuya ilgili kontrol veya bileşik dozundan [3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid (1 µM, 10 µM, 100 µM ve 200 µM); 4-Aminocarbonylphenylboronic acid (1 µM, 10 µM, 100 µM ve 200 µM); bortezomib (10 nM, 100 nM, 1 µM ve 10 µM)] üç tekrarlı (n = 3) olacak şekilde 100 µl ilave edilir. Mikropate 48 saat süreyle %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık sağlayan CO₂ inkübatörüne koyulur [3, 26].

2.9. MTT Analizi

48 saat süreyle uygulanan 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid, 4-Aminocarbonylphenylboronic acid ve bortezomib'in PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelerdeki IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration; yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu) değerlerinin hesaplanması MTT [3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide] analizi ile gerçekleştirilmiştir. MTT uygulaması öncesinde tüm muamelelere ait kuyulardaki hücrelerin morfolojileri inverted mikroskop altında 10X büyütme ile incelenir ve fotoğrafları çekilir. Daha sonra MTT uygulamasına geçilir. Öncelikle, kuyulardaki besiyeri aspire edilir. Sonrasında her bir kuyuya 0.5 µg/µl MTT ve %0.5 FBS içeren 100 µl DMEM besiyeri ilave edilir. Daha sonra mikropate hafifçe el ile karıştırılır ve 4 saat süreyle %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık sağlayan CO₂ inkübatöründe inkübe edilir. Süre sonunda, MTT içeren besiyeri her bir kuyudan aspire edilerek uzaklaştırılır. Her bir kuyuya 50 µl DMSO ilave edilir ve formazan kristallerinin tamamen çözünmesini sağlamak amacıyla çek-bırak yapılarak hücreler homojenize edilir. Mikropate 15 dakika süreyle orbital çalkalayıcıda çalkalanır. Son olarak numunelerin absorbans değerleri, 570 nm ve 630 nm dalga boyunda Thermo Scientific Multiskan GO marka multiplate okuyucu kullanılarak ölçülür [27, 28, 29].

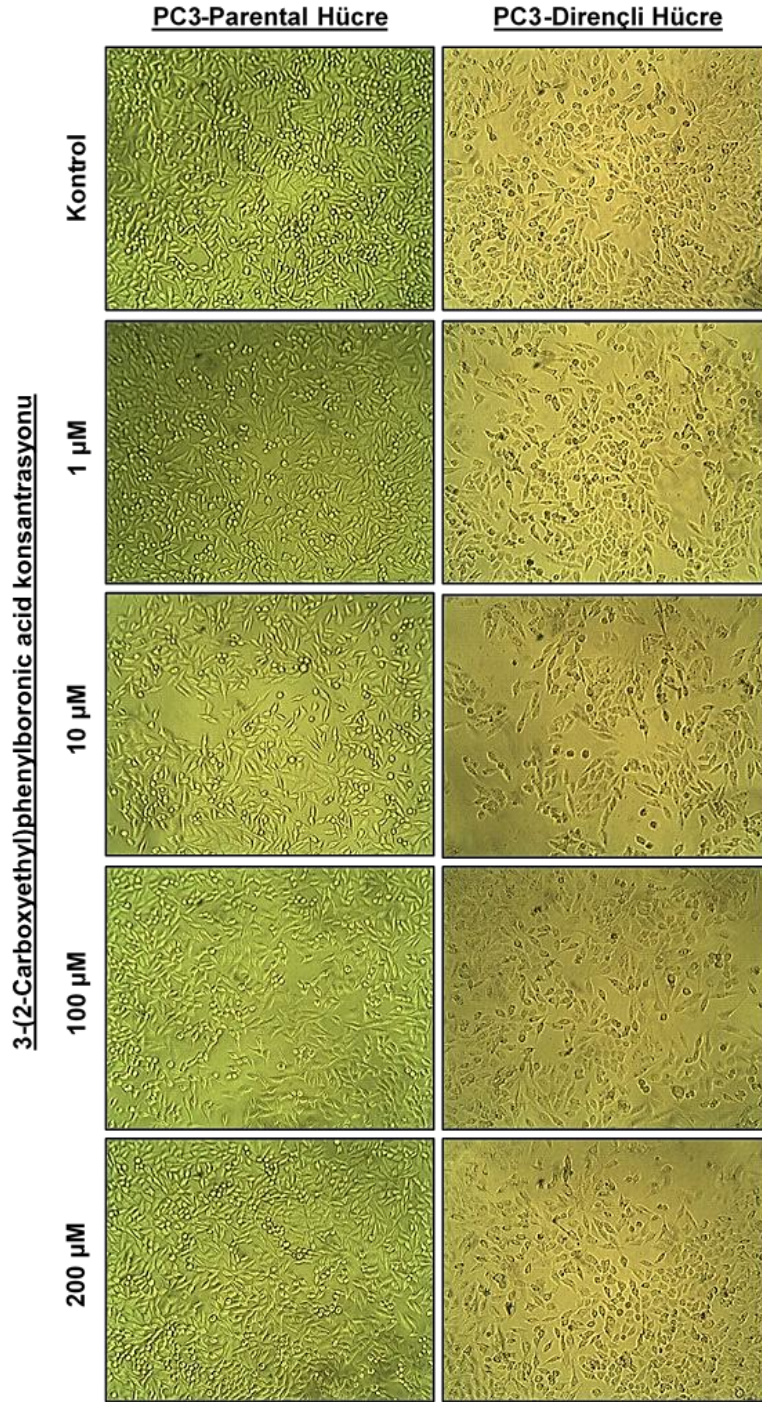
2.10. İstatistiksel Analizler

IC₅₀ değerlerini hesaplamak için, GraphPad Prism 5 istatistik programı kullanılarak MTT analizi sonucu elde edilen absorbans değerleri analiz edilmiş ve grafik çizimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle en yüksek kontrol absorbans değeri baz alınarak tüm muamelelerin absorbans değerleri yüzdelik değere çevrilmiştir. Daha sonra her bir kontrol veya bileşik muamelesine ait tekrarların ortalaması alınmış ve log₁₀ değerine dönüştürülmüştür. Sonrasında IC₅₀ değerleri, GraphPad Prism 5 istatistik programında nonlinear regression parametresi kullanılarak log(inhibitor) vs. normalized response denklemi ile tespit edilmiştir [7, 9, 30].

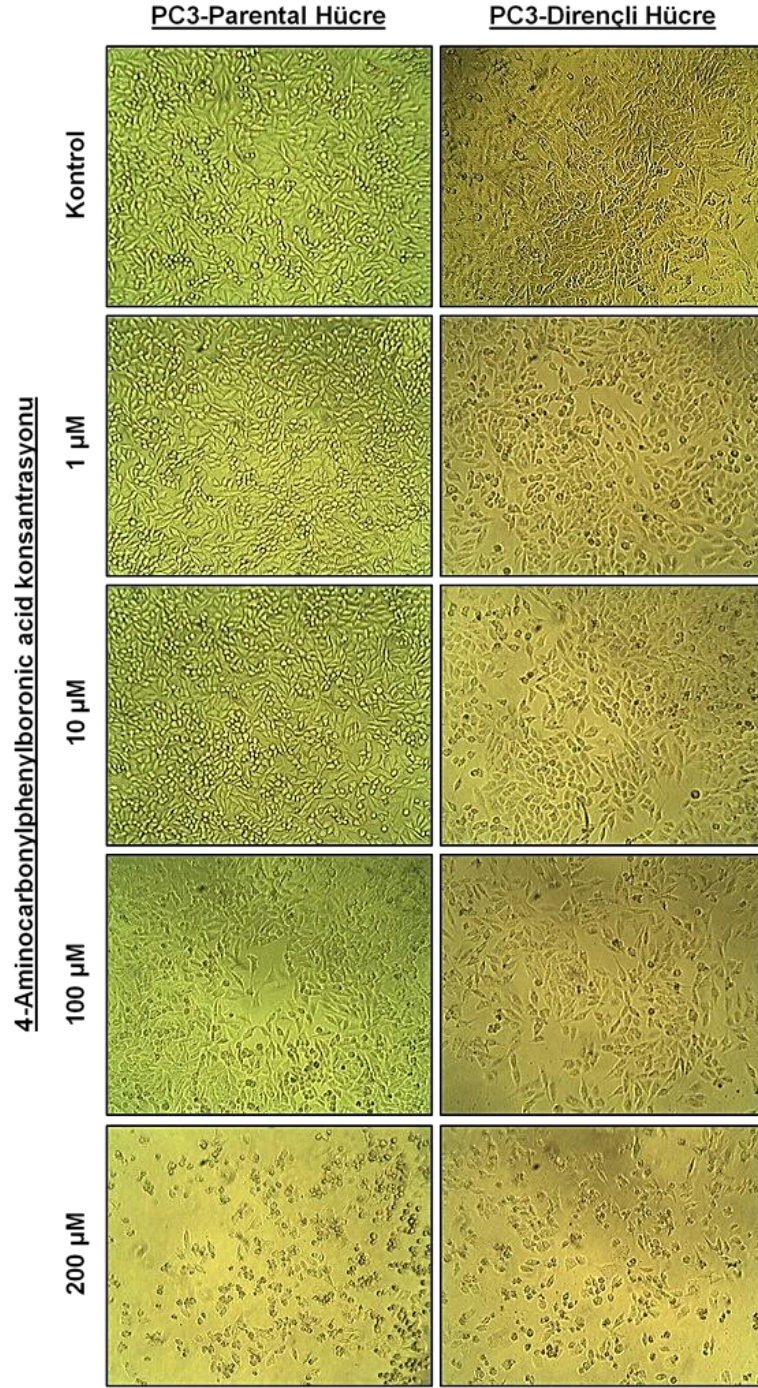
3. Bulgular

PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücreler, çeşitli konsantrasyonlardaki 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid, 4-Aminocarbonylphenylboronic acid veya bortezomib ile 48 saat süreyle muamele edildikten sonra, MTT analizi

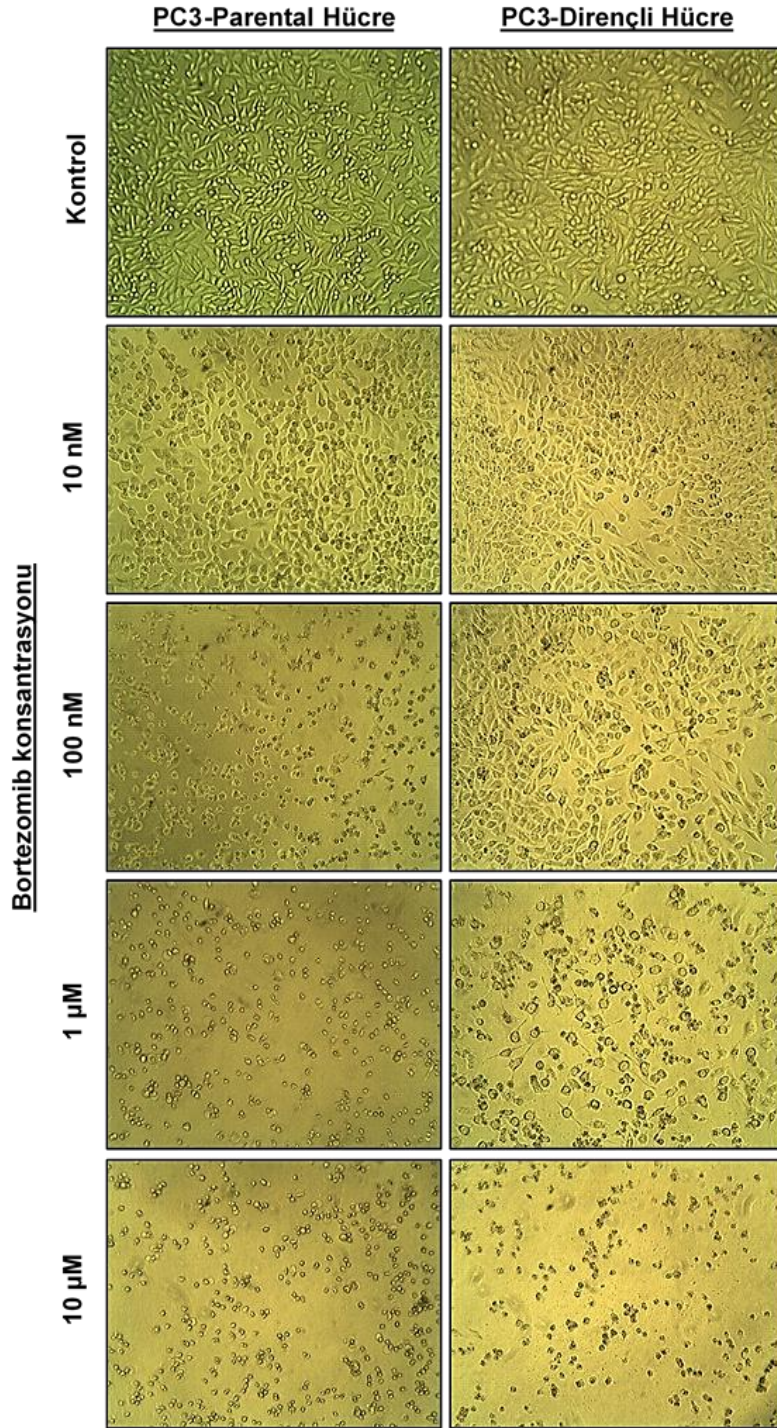
gerçekleştirilmeden önce bu bileşik muamelelerinin PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücreler üzerinde meydana getirdiği sitotoksik etkileri gözlemlemek adına tüm muamelelere ait kuyulardaki PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelerin morfolojileri 10X büyütme ile inverted mikroskop kullanılarak incelenmiş ve her bir kuyunun fotoğraf çekimi işlemi gerçekleştirilmiştir. PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelere ait hücre morfolojisi görüntüleri detaylı bir şekilde incelendiğinde, 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid bileşiğinin PC3-Parental hücrelerde kontrol muamelesine göre 10 μ M konsantrasyonda bir miktar etki göstermekle birlikte belirlenen konsantrasyon aralıklarında anlamlı bir sitotoksik etki meydana getirmediği gözlenmiştir (1 μ M - 200 μ M arası). 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid bileşiğinin PC3-Dirençli hücrelerde ise yine kontrol muamelesine göre 10 μ M konsantrasyonda kısmi bir etki meydana getirse de belirlenen konsantrasyon aralıklarında anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir (1 μ M - 200 μ M arası) (Şekil 1). 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiğinin PC3-Parental hücrelerde 100 μ M konsantrasyondan başlamak üzere özellikle 200 μ M konsantrasyonda önemli bir sitotoksik etki meydana getirdiği tespit edilmiştir. 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiğinin PC3-Dirençli hücrelerde ise 200 μ M konsantrasyonda önemli sitotoksik etki oluşturduğu görülmüştür (Şekil 2). Bortezomib bileşiğinin PC3-Parental hücrelerde 10 nM konsantrasyondan başlamak üzere özellikle 100 nM, 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda çok önemli sitotoksik etkiler meydana getirdiği ve neredeyse hücrelerin tamamına yakını yok ettiği belirlenmiştir. Bortezomib bileşiğinin PC3-Dirençli hücrelerde ise 1 μ M konsantrasyondan başlamak üzere özellikle 10 μ M konsantrasyonda önemli bir sitotoksik etki meydana getirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3). Mikroplate üzerindeki kuyuların tamamının fotoğraf çekim işlemi gerçekleştirildikten sonra kuyularda bulunan hücreler 4 saat süreyle MTT ile muamele edilmiş ve sonrasında kuyulardaki numunelerin absorbans değerleri multiplate okuyucu yardımıyla 570 nm ve 630 nm dalga boyunda ölçülerek tespit edilmiştir. MTT analizi sonrasında, GraphPad Prism 5 istatistik programı kullanılarak ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerlerinin analizi gerçekleştirilmiş, grafik çizimleri yapılmış ve nonlinear regression parametresi kullanılarak log(inhibitor) vs. normalized response denklemi ile IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.



Şekil 1. Çeşitli konsantrasyonlarda 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid ile 48 saat süreyle muamele edilen PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelerin morfolojileri.



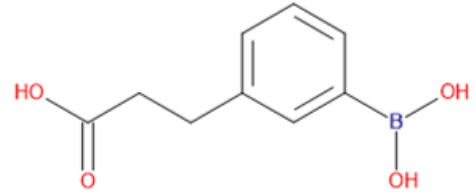
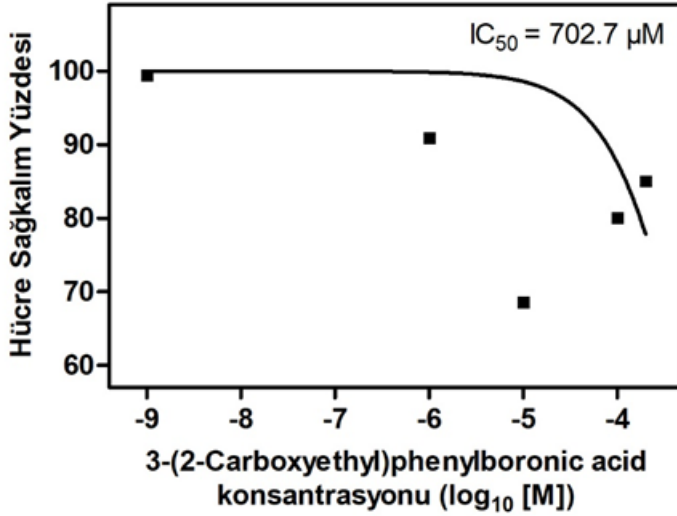
Şekil 2. Çeşitli konsantrasyonlarda 4-Aminocarbonylphenylboronic acid ile 48 saat süreyle muamele edilen PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelerin morfolojileri.



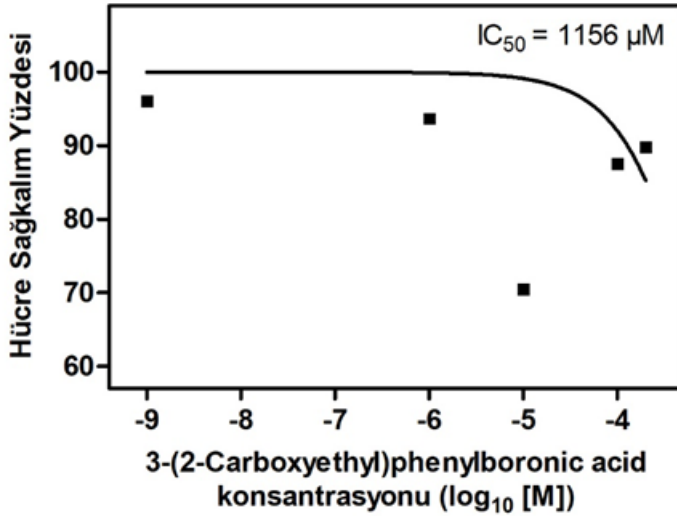
Şekil 3. Çeşitli konsantrasyonlarda bortezomib ile 48 saat süreyle muamele edilen PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelerin morfolojileri.

İstatistiki analizler sonucunda, 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid bileşiğinin (kimyasal yapısı Şekil 4A'da sunulmuştur) IC_{50} değeri, PC3-Parental hücrelerde $702.7 \mu M$ ($n = 2-3$) (Şekil 4A); PC3-Dirençli hücrelerde ise $1156 \mu M$ ($n = 2-3$) (Şekil 4B) olarak tespit edilmiştir.

A PC3-Parental Hücre



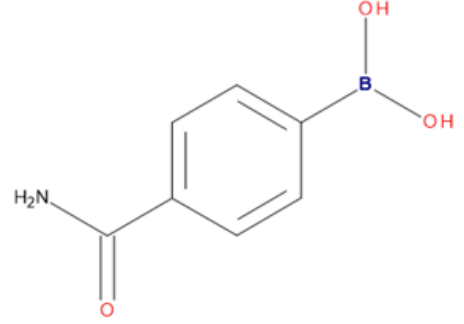
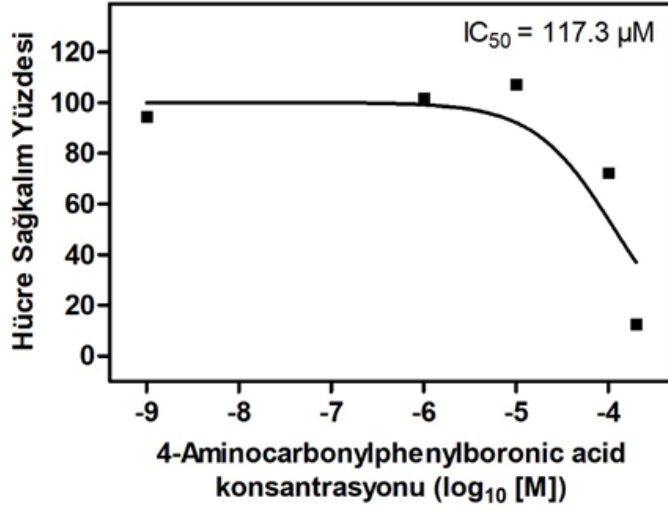
B PC3-Dirençli Hücre



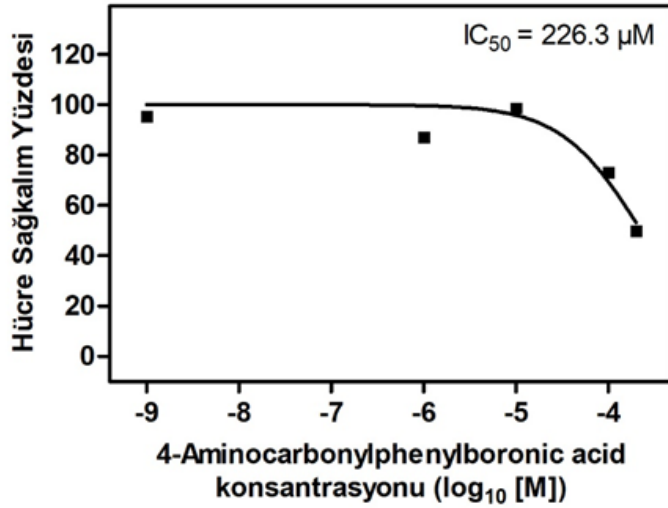
Şekil 4. 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid bileşiğinin (A) PC3-Parental ve (B) PC3-Dirençli hücrelerdeki IC_{50} değerleri. Hücreler 48 saat süre ile muamele edilmişlerdir, bileşiğin kimyasal yapısı [Ref. 31]'den uyarlanarak Symyx Draw 4.0 programı ile tekrar çizilmiştir.

4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiğinin (kimyasal yapısı Şekil 5A’da sunulmuştur) IC_{50} değerinin, PC3-Parental hücrelerde $117.3 \mu M$ ($n = 2-3$) (Şekil 5A); PC3-Dirençli hücrelerde ise $226.3 \mu M$ ($n = 2-3$) (Şekil 5B) olduğu belirlenmiştir.

A PC3-Parental Hücre



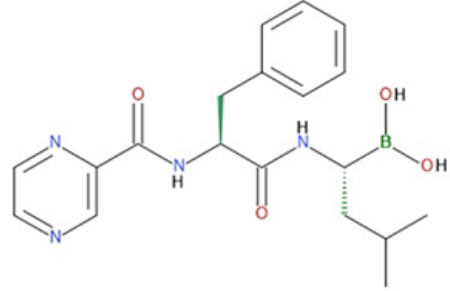
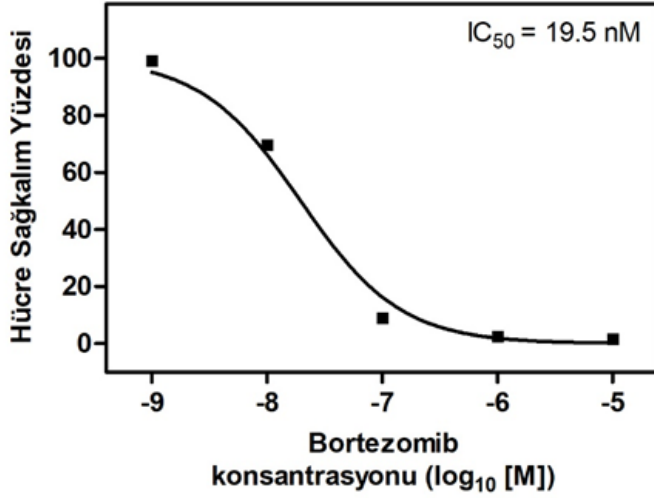
B PC3-Dirençli Hücre



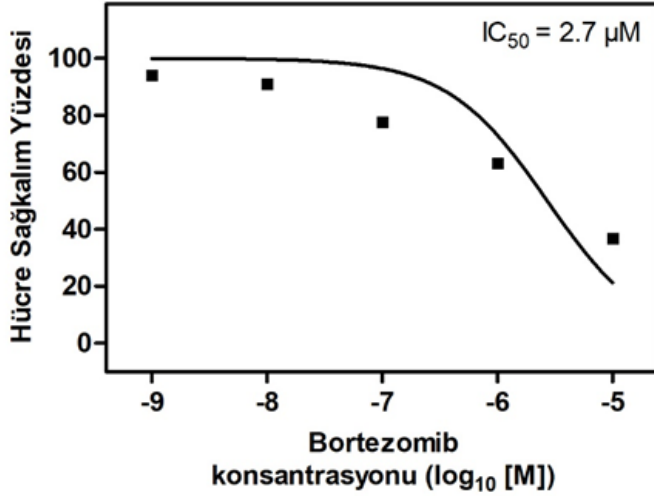
Şekil 5. 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiğinin (A) PC3-Parental ve (B) PC3-Dirençli hücrelerdeki IC_{50} değerleri. Hücreler 48 saat süre ile muamele edilmişlerdir, bileşiğin kimyasal yapısı [Ref. 32]’den uyarlanarak Symyx Draw 4.0 programı ile tekrar çizilmiştir.

Son olarak bortezomib bileşiğinin (kimyasal yapısı Şekil 6A’da sunulmuştur) IC_{50} değeri, PC3-Parental hücrelerde 19.5 nM ($n = 2-3$) (Şekil 6A); PC3-Dirençli hücrelerde ise 2.7 μ M ($n = 2-3$) (Şekil 6B) olarak hesaplanmıştır.

A PC3-Parental Hücre



B PC3-Dirençli Hücre



Şekil 6. Bortezomib bileşiğinin (A) PC3-Parental ve (B) PC3-Dirençli hücrelerdeki IC_{50} değerleri. Hücreler 48 saat süre ile muamele edilmişlerdir, bileşiğin kimyasal yapısı [Ref. 33]'ten uyarlanarak Symyx Draw 4.0 programı ile tekrar çizilmiştir.

4. Tartışma

Günümüze kadar gerçekleştirilen birçok çalışmada bortezomib tedavisine yanıt olarak ilaç direncinin hızla geliştiği rapor edilmiştir. Örneğin, Oerlemans ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, insan miyelomonositik THP1 hücrelerinde bortezomib direncinin proteozom $\beta 5$ -alt birimi (PSMB5) proteininde Ala49Thr mutasyonu ve diğer proteozomal alt birimlerde (örneğin; PSMB6, PSMB7 ve PSMA7) herhangi bir değişiklik olmaksızın PSMB5'in dramatik bir şekilde (60 kata kadar) aşırı eksprese edilmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [16]. Wu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, iki adet bortezomibe dirençli hepatoselüler karsinoma (HCC) hücre hattı oluşturulmuş ve bortezomibe dirençli HCC hücrelerinde $\beta 1$ ve $\beta 5$ proteozom alt birimlerinin ekspresyonunun arttığı; ancak $\beta 5$ -alt birimindeki bortezomib bağlanma bölgesinde herhangi bir mutasyon tespit edilmediği bildirilmiştir [17]. Daha önce Yerlikaya ve Okur tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, PC3 prostat kanseri hücre hattı model sistem olarak kullanılarak 26S proteozom inhibitörü bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizmaları araştırılmıştır. Çalışma kapsamında, öncelikle PC3-Dirençli hücre eldesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın devamında edinilen bulgulara göre, parental hücrelerde PSMB5'in prekürsör formunun konsantrasyona bağlı olarak aşırı eksprese edildiği, dirençli hücre hattında ise bu proteinin işlenmesinde herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca poliubiquitinlenmiş konjugatların düzeyi PC3-Parental hücrelerde PC3-Dirençli hücrelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bunun yanı sıra, siklin D1 ekspresyonu parental hücrelerde belirgin bir şekilde azalırken, dirençli hücrelerdeki değişimin anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, yeni ve daha etkili kanser tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için proteozom inhibitörlerine karşı gelişen direnç mekanizmalarının ayrıntılı olarak anlaşılmasına ihtiyaç bulunmaktadır [3].

Tüm belirtilen bu açıklama ve sebeplerden dolayı çalışmamızın temeli; PC3-Parental ve bortezomibe dirençli PC3-Dirençli hücreler üzerinde diğer bazı bor içeren bileşiklerin sitotoksik etkilerini ve PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelerde etki düzeyinde farklılık olup olmadığını araştırmak üzerine kurulmuştur. Çalışmalarımızda daha önce Yerlikaya ve Okur tarafından bortezomib direnci geliştirilen PC3-Dirençli hücreler kullanılmıştır [3]. Bor içeren bileşikler, özellikle de boronik asit türevleri, kimyasal özellikleri ve proteozomal hedeflerle etkileşime girme yetenekleri nedeniyle umut verici adaylar oldukları için çalışmalarımızda 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid ve 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşikleri tercih edilmiştir. Ayrıca yaygın olarak kullanılan bor içeren bir bileşik olduğu için ve çalışmalarımızda kullandığımız PC3-Dirençli hücrelere direnç bortezomib ile kazandırıldığı için; hem daha önce elde edilen verileri teyit etmek [3, 26] hem de direnç seviyesinin kontrolü ve/veya direnç fenotipinde geri dönüşüm olup olmadığını kontrol etmek amacıyla referans ilaç olarak çalışmalarımıza bortezomib bileşiği de dahil edilmiştir.

Çalışmalarımız kapsamında öncelikle PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücreler çeşitli konsantrasyonlarda 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid, 4-Aminocarbonylphenylboronic acid veya bortezomib ile 48 saat süreyle muamele edilmiştir. 48 saat süren inkübasyon sonrasında, mikroskop altında hücre morfolojileri incelenmiş ve her bir kuyunun fotoğraf çekimi işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra MTT uygulaması ve istatistiki analizler gerçekleştirilmiştir. PC3-Parental ve PC3-Dirençli hücrelere ait hücre morfolojisi görüntüleri incelendiğinde, 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid bileşiğinin hem PC3-Parental hem de PC3-Dirençli hücrelerde belirlenen konsantrasyon aralıklarında anlamlı bir sitotoksik etki meydana getirmediği belirlenmiştir (1 μM - 200 μM arası) (Şekil 1). MTT bir sağkalım testi olduğu için canlı kalan hücre sayısını belirleyen bir hücre testidir. Bu da ilaç toksisitesi hakkında bilgi vermektedir. İlaç uygulaması sonrası canlı hücre sayısında veya metabolik aktivitede azalma gözlenmesi, toksik etki varlığı şeklinde yorumlanmaktadır. MTT analizi ve istatistiki analizler sonucunda, 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid bileşiğinin 48 saat muamele sonrasında IC_{50} değeri, PC3-Parental hücrelerde 702.7 μM ; PC3-Dirençli hücrelerde ise 1156 μM olarak hesaplanmıştır. Morfoloji analizi sonuçları ve MTT analizi sonuçları son derece tutarlılık göstermektedir. 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid bileşiğinin IC_{50} değeri, direnç kazandırılmış PC3-Dirençli hücrelerde PC3-Parental hücrelere göre 1.65 kat daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4A; Şekil 4B). Hücre morfolojisi görüntüleri incelendiğinde, 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiğinin PC3-Parental hücrelerde 100 μM konsantrasyondan başlamak üzere özellikle 200 μM konsantrasyonda ciddi bir sitotoksik

etki meydana getirdiği; PC3-Dirençli hücrelerde ise 200 μM konsantrasyonda önemli bir sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). MTT analizi ve istatistiki analizlerin sonuçlarına bakıldığında, 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiğinin 48 saat muamele sonrasında IC_{50} değeri, PC3-Parental hücrelerde 117.3 μM ; PC3-Dirençli hücrelerde ise 226.3 μM olarak bulunmuştur. Elde edilen bu veriler, morfoloji analizi sonuçları ve MTT analizi sonuçları arasında tutarlılık bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiğinin IC_{50} değerinin, PC3-Dirençli hücrelerde PC3-Parental hücrelere nazaran 1.93 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 5A; Şekil 5B). Son olarak hücre morfolojisi görüntüleri bortezomib bileşiğinin, PC3-Parental hücrelerde 10 nM konsantrasyondan başlamak üzere özellikle 100 nM, 1 μM ve 10 μM konsantrasyonlarda dramatik sitotoksik etkiler meydana getirdiğini ve hemen hemen hücrelerin tamamına yakını yok ettiğini; PC3-Dirençli hücrelerde ise 1 μM konsantrasyondan başlamak üzere özellikle 10 μM konsantrasyonda önemli bir sitotoksik etki meydana getirdiğini göstermiştir (Şekil 3). MTT analizi ve istatistiki analizler değerlendirildiğinde, bortezomibin 48 saat muamele sonrasında IC_{50} değeri, PC3-Parental hücrelerde 19.5 nM; PC3-Dirençli hücrelerde ise 2.7 μM olarak hesaplanmıştır. Morfoloji analizi sonuçları ve MTT analizi sonuçları arasında tutarlılık olduğu görülmüştür. İlâveten, bortezomib bileşiğinin IC_{50} değerinin, PC3-Dirençli hücrelerde PC3-Parental hücreler ile kıyaslandığında yaklaşık olarak 138 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6A; Şekil 6B).

5. Sonuç

Öncelikle 48 saat süreli bortezomib muamelesi sonrasında PC3-Parental hücrelere kıyasla PC3-Dirençli hücrelerde görülen IC_{50} değerindeki yaklaşık 138 katlık artış; PC3-Dirençli hücrelerde kazanılmış olan bortezomib direnci fenotipinin devam ettiğini göstermiştir. Ayrıca bu sonucun daha önceki çalışmalarda elde edilmiş olan veriler ile uyumlu olduğunu işaret etmiştir [3, 26]. Görüldüğü üzere bortezomib PC3-Parental hücrelerde nM düzeyinde ciddi sitotoksik etkiler meydana getirirken; PC3-Dirençli hücrelerde μM seviyelerinde sitotoksik etki meydana getirebilmektedir. Bor içeren 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid ve 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiklerinin her ikisi de μM düzeyinde sitotoksik etki meydana getirmekle birlikte PC3-Dirençli hücrelerde PC3-Parental hücrelere kıyasla IC_{50} değerinde sırasıyla sadece 1.65 kat ve 1.93 kat artış meydana gelmesi bortezomibe nazaran daha az kemoresistans geliştirdikleri anlamına gelebilecektir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 3-(2-Carboxyethyl)phenylboronic acid ve 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiklerinin 4T1 meme kanseri hücrelerinde 24 saate kadar yapılan muameleler sonucunda sitotoksik etki göstermedikleri raporlanmıştır [34]. Ancak bu mevcut çalışmada ise PC3 prostat kanseri hücrelerinde 48 saate kadar yapılan muameleler sonucunda sitotoksik etki gösterdikleri görülmüştür. Bu sonuç, her iki bileşiğin de zamana-bağı ve/veya hücre-spesifik etkileri olabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca literatür taramalarımız her iki bileşiğin de kanser hücre kültürleri üzerinde Yerlikaya ve arkadaşları tarafından 2026 yılında 4T1 hücre kültürleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmaları [34] dışında henüz araştırılmadığını göstermektedir. Bu bağlamda elde edilen bulguların orijinal olduğu düşünülmektedir. Özellikle, 4-Aminocarbonylphenylboronic acid bileşiği daha düşük bir IC_{50} değerine sahip olduğu için; daha detaylı analizler ile etkilerinin araştırılmasının faydalı olabileceği ve bazı fonksiyonel grupların eklenerek veya çıkarılarak modifiye edilmesi gibi kimyasal düzenlemeler yapılarak ya da sisplatin gibi diğer etkili bileşikler ile kombinasyon denemeleri gerçekleştirilerek daha düşük konsantrasyonlarda daha etkili olabilecek kanser tedavi yaklaşımları sunulabileceği kanaatindeyiz.

Teşekkür

Bu makale, yazarlar arasında yer alan Nada Ahmed Khalaf Dulaimi'nin yüksek lisans çalışmalarında elde edilen veriler ile üretilmiştir.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmektedir.

Kaynakça

- [1] R. W. Ruddon, "Cancer Biology". Fourth Edition, *Oxford University Press*, 530 p, 2007.
- [2] X. Guan, "Cancer metastases: challenges and opportunities". *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 402-418, 2015.
- [3] A. Yerlikaya, E. Okur, "An investigation of the mechanisms underlying the proteasome inhibitor bortezomib resistance in PC3 prostate cancer cell line". *Cytotechnology*, 72(1), 121-130, 2020.
- [4] H. Zahreddine, K. L. Borden, "Mechanisms and insights into drug resistance in cancer". *Frontiers in Pharmacology*, 4, 28, 2013.
- [5] L. Chen, K. Madura, "Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue". *Cancer Research*, 65(13), 5599-5606, 2005.
- [6] J. Adams, "The proteasome as a novel target for the treatment of breast cancer". *Breast Disease*, 15, 61-70, 2002.
- [7] A. Yerlikaya, N. Erin, "Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor velcade". *International Journal of Molecular Medicine*, 22(6), 817-823, 2008.
- [8] M. Escobar, M. Velez, A. Belalcazar, E. S. Santos, L. E. Racz, "The role of proteasome inhibition in nonsmall cell lung cancer". *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 806506, 2011.
- [9] E. Okur, A. Yerlikaya, "A novel and effective inhibitor combination involving bortezomib and OTSSP167 for breast cancer cells in light of label-free proteomic analysis". *Cell Biology and Toxicology*, 35(1), 33-47, 2019.
- [10] J. Adams, "The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs". *Cancer Cell*, 5, 417-421, 2004.
- [11] S. N. Markovic, S. M. Geyer, F. Dawkins, W. Sharfman, M. Albertini, W. Maples, P. M. Fracasso, T. Fitch, P. Lorusso, A. A. Adjei, C. Erlichman, "A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma". *Cancer*, 103, 2584-2589, 2005.
- [12] D. J. Kuhn, E. L. Zeger, R. Z. Orlowski, "Proteasome inhibitors and modulators of heat shock protein function". *Update on Cancer Therapeutics I*, 91-116, 2006.
- [13] L. Y. Schumacher, D. D. Vo, H. J. Garban, B. Comin-Anduix, S. K. Owens, V. B. Disette, J. A. Glaspy, W. H. McBride, B. Bonavida, J. S. Economou, A. Ribas, "Immunosensitization of tumor cells to dendritic cell-activated immune responses with the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, velcade)". *The Journal of Immunology*, 176, 4757-4765, 2006.
- [14] P. Queirolo, M. Acquati, "Targeted therapies in melanoma". *Cancer Treatment Reviews*, 32(7), 524-531, 2006.
- [15] Z. H. Tang, Y. L. Wu, S. L. Gao, H. W. Shen, "Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells". *Journal of Surgical Research*, 145, 111-12, 2008.
- [16] R. Oerlemans, N. E. Franke, Y. G. Assaraf, J. Cloos, I. Van Zantwijk, C. R. Berkens, G. L. Scheffer, K. Debipersad, K. Vojtekova, C. Lemos, J. W. Van Der Heijden, B. Ylstra, G. J. Peters, G. L. Kaspers, B. A. C. Dijkman, R. J. Scheper, G. Jansen, "Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit $\beta 5$ (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein". *Blood*, 112(6), 2008.
- [17] Y. X. Wu, J. H. Yang, H. Saito, "Bortezomib-resistance is associated with increased levels of proteasome subunits and apoptosis-avoidance". *Oncotarget*, 7, 77622-77634, 2016.
- [18] P. D. Baade, D. R. Youlden, L. J. Krnjacki, "International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends". *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 2, 171-184, 2009.
- [19] D. G. Bostwick, H. B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S. M. Ho, J. Landolph, H. Morrison, B. Sonawane, T. Shifflett, D. J. Waters, B. Timms, "Human prostate cancer risk factors". *Cancer*, 101(S10), 2371-2490, 2004.
- [20] A. Chlenski, K. I. Nakashiro, K. V. Ketels, G. I. Korovaitseva, R. Oyasu, "Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer cell lines". *Prostate*, 47(1), 66-75, 2001.
- [21] G. Buchanan, P. S. Craft, M. Yang, A. Cheong, J. Prescott, L. Jia, G. A. Coetzee, W. D. Tilley, "PC-3 cells with enhanced androgen receptor signaling: a model for clonal selection in prostate cancer". *Prostate*, 60(4), 352-366, 2004.
- [22] O. S. Mohammad, M. D. Nyquist, M. T. Schweizer, S. P. Balk, E. Corey, S. Plymate, P. S. Nelson, E. A. Mostaghel, "Supraphysiologic testosterone therapy in the treatment of prostate cancer: models, mechanisms and questions". *Cancers*, 9(12), 166, 2017.
- [23] I. V. Litvinov, L. Antony, S. L. Dalrymple, R. Becker, L. Cheng, J. T. Isaacs, "PC3, but not DU145, human prostate cancer cells retain the coregulators required for tumor suppressor ability of androgen receptor". *The Prostate*, 66(12), 1329-1338, 2006.
- [24] C. A. Martins, G. D. G. Rocha, C. R. Gattass, C. M. Takiya, "Pomolic acid exhibits anticancer potential against a docetaxel-resistant PC3 prostate cell line". *Oncology Reports*, 42(1), 328-338, 2019.
- [25] S. T. Nawrocki, J. S. Carew, K. Dunner, L. H. Boise, P. J. Chiao, P. Huang, J. L. Abbruzzese, D. J. McConkey, "Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells". *Cancer Research*, 65(24), 11510-11519, 2005.
- [26] S. Şeker, B. Şahin, A. Yerlikaya, "Comparative analysis of acquired resistance to bortezomib in prostate cancer cells using proteomic and bioinformatic tools". *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 29(1), e70254, 2025.
- [27] A. Yerlikaya, E. Okur, S. Şeker, N. Erin, "Combined effects of the proteasome inhibitor bortezomib and Hsp70 inhibitors on the B16F10 melanoma cell line". *Molecular Medicine Reports*, 3(2), 333-339, 2010.
- [28] A. Yerlikaya, S. Altıkat, R. İrmak, F. Z. Çavga, S. A. Kocacan, İ. Boyacı, "Effect of bortezomib in combination with cisplatin and 5 fluorouracil on 4T1 breast cancer cells". *Molecular Medicine Reports*, 8(1), 277-281, 2013.

- [29] Ş. A. Düzgün, A. Yerlikaya, S. Zeren, Z. Bayhan, E. Okur, İ. Boyacı, "Differential effects of p38 MAP kinase inhibitors SB203580 and SB202190 on growth and migration of human MDA-MB-231 cancer cell line". *Cytotechnology*, 69(4), 711-724, 2017.
- [30] B. Aras, A. Yerlikaya, "Bortezomib and etoposid combinations exert synergistic effects on PC-3 prostate cancer line". *Oncology Letters*, 11, 3179-3184, 2016.
- [31] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3856118>
- [32] D. Jiang, M. Zheng, X. Yan, B. Huang, H. Huang, T. Gong, K. Liu, J. Liu, "A "turn-on" ES IPT fluorescence probe of 2-(aminocarbonyl)phenylboronic acid for the selective detection of Cu(ii)". *RSC Advances*, 12(48), 31186-31191, 2022.
- [33] A. Paramore, S. Frantz, "Bortezomib". *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(8), 611-612, 2003.
- [34] A. Yerlikaya, E. Tümer, M. Güzel, "Comparative investigation of cytotoxic effects of structurally diverse small molecules and in silico analysis of 1-Acetyl-4-(4-Hydroxyphenyl)piperazine". *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 30(1), e70890, 2026.